

# **Versuche zur Produktionsoptimierung von Tubulysin**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

**Dissertation**

von  
Jürgen Heil  
aus Meppen

1. Referent: Prof. Dr. Hans Reichenbach

2. Referent: PD Dr. Sigmund Lang

eingereicht am: 13.12.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.03.2000

Druckjahr: **2000**

Die vorliegende Arbeit wurde unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans Reichenbach an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig angefertigt. Herrn Prof. Dr. Reichenbach danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine Anregungen und die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft. Herrn PD Dr. Sigmund Lang danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Kollegen aus dem Doktorandenlabor, sowie bei allen Kollegen der Abteilung Naturstoffbiologie, für die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen bedanken.

Herrn Dr. Florenz Sasse danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, für die häufigen, wertvollen Diskussionen, für die Hilfestellungen im Bereich der tierischen Zellkulturen und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Heinrich Steinmetz danke ich für die Zusammenarbeit und für die Hilfe bei der Tubulysinanalytik.

Herrn Dr. Schüler und den Mitarbeitern aus dem Technikum der GBF danke ich für die Durchführung der Fermentationen im großen Maßstab.

Herrn Peter Knauth danke ich für die vielen Diskussionen und die motivierenden und aufmunternden Unterhaltungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium bis zum Abschluß ermöglicht haben und mir auf dem Weg zur Promotion immer zur Seite standen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Myxobakterien.....	1
1.2	Sekundärmetabolite .....	2
1.3	Antibiotika aus Myxobakterien .....	2
1.4	Produktionsoptimierung .....	4
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1	Organismen.....	7
2.2	Kultivierungsmedien und Chemikalien .....	7
2.2.1	Standardmedien .....	7
2.2.2	Modifizierte M7-Nährbouillons.....	8
2.2.3	Medien zur Optimierung der Plattierungsausbeute.....	8
2.2.4	Medien und Puffer für tierische Zellkulturen .....	9
2.2.5	Chemikalien .....	9
2.3	Kultivierungsmethoden.....	10
2.3.1	Schüttelkolbenversuche .....	10
2.3.2	Fermentationen im 4,5-L-Maßstab .....	10
2.3.3	Fermentation im 10-L-Maßstab .....	12
2.3.4	Fermentation im 300-L-Maßstab .....	13
2.4	XAD-Eluate .....	14
2.5	Klonierung und Mutagenese von Myxobakterien .....	14
2.6	Analysemethoden .....	15
2.6.1	HPLC zur Tubulylinbestimmung .....	15
2.6.2	Dünnschichtchromatographie .....	16
2.6.3	Cytotoxizitätstest zur Tubulylinbestimmung .....	17
2.6.4	Bestimmung von <i>o</i> -Phosphat .....	18
2.6.5	Zellzahlbestimmung und optische Dichte.....	18
2.7	Zellernte und Zellaufschluß.....	18
2.7.1	Zuckerbestimmung mittels HPLC .....	19
2.7.2	Enzymatische Zucker- und Stärkebestimmung .....	19
2.8	Medienoptimierung.....	21
2.8.1	Griechisch-Lateinisches Quadrat (GLQ) .....	21
2.8.2	Phosphatgehalt .....	22
2.8.3	Spurenelemente .....	22
2.8.4	Genetischer Algorithmus .....	23
2.9	Immobilisierung von Myxobakterien .....	27
2.10	Sauerstoffübergangsrate .....	27
2.11	Harz-Abrieb im 6-L-Bioreaktor.....	28
2.12	Einbauversuche.....	28

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	Analysemethoden für Tubulysin.....	30
3.1.1	DC-Analytik.....	30
3.1.2	HPLC-Analytik.....	32
3.2	Tubulysinproduktion verschiedener Stämme von <i>Archangium gephyra</i> .....	33
3.3	Einfluß verschiedener komplexer Stickstoffquellen auf das Wachstum von Ar315 ....	34
3.4	Wachstums- und Produktionsverhalten von Ar315 im Schüttelkolben.....	36
3.5	Auswirkung von XAD-16 auf die Produktion von Tubulysin.....	36
3.6	Plattierungsausbeuten unterschiedlicher Medien .....	37
3.7	Merkmale innerhalb einer Kolonipopulation von <i>Archangium gephyra</i> .....	38
3.7.1	Produktionsverteilung von Tubulysin A innerhalb einer Kolonipopulation.....	38
3.7.2	Produktionsverteilung von Tubulysin A nach Mutagenisierung an Ar315 K4.7 ....	40
3.7.3	Substanzspektrum .....	40
3.8	Alginateingehüllte Zellen im Vergleich zu nativen Zellen.....	41
3.9	Einfluß von Medienvariationen auf die Tubulysinproduktion .....	43
3.9.1	Phosphat.....	43
3.9.2	pH-Wert .....	45
3.9.3	Spurenelemente.....	46
3.9.4	Griechisch-lateinisches Quadrat .....	48
3.10	Radioaktiver Einbau von Aminosäuren in Tubuysin.....	50
3.10.1	<sup>14</sup> C-L-Tyrosin .....	50
3.10.2	<sup>35</sup> S-L-Cystein.....	51
3.10.3	<sup>14</sup> C-L-Lysin .....	51
3.10.4	<sup>14</sup> C-L-Phenylalanin.....	52
3.11	Einfluß von potentiellen Prekursoren auf die Tubulysinproduktion .....	53
3.11.1	L-Tyrosin.....	54
3.11.2	L-Lysin .....	54
3.11.3	D-L-Pipecolinsäure .....	56
3.12	Genetischer Algorithmus zur Optimierung der Konzentrationsverhältnisse von Aminosäuren.....	56
3.13	Kohlenhydratverbrauch .....	60
3.14	Technische Untersuchungen an Biorektoren.....	65
3.14.1	Sauerstoffübergangsrate im Laborbioreaktor .....	65
3.14.2	Adsorberharz-Abrieb im 6-L-Bioreaktor.....	66
3.14.3	Vergleich der Probennahmesysteme im Laborbioreaktor und im 300-L-Technikumsbioreaktor .....	68
3.15	Fermentationen im 4,5-L-Maßstab .....	68
3.15.1	Änderung des Sauerstoffpartialdrucks.....	68
3.15.2	Zufütterungsversuche.....	73
3.16	Fermentation im 10-L-Maßstab.....	79

3.17	Fermentation im 300-L-Maßstab.....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>95</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Chemische Struktur der Tubulysine .....	3
Abb. 2:	Dimensionen des 300-L-Bioreaktors mit 2 Blattrührern und Begasungsring .....	13
Abb. 3:	Ablaufschema des Genetischen Algorithmus zur Medienoptimierung).....	26
Abb. 4:	Dünnschichtplatte nach Auftrennung von XAD-Extrakten, bzw. Tubulysin-A- Standards .....	30
Abb. 5:	UV-Spektren von Flecken auf einer HPTLC-Platte nach Lauf eines Tubulysin A- Standards bzw. eines XAD-Extraktes von <i>Archangium gephyra</i> .....	31
Abb. 6:	Qualität der DC-Analytik .....	32
Abb. 7:	HPLC-Chromatogramme von Tubulysinstandards und von Kulturextrakten .....	33
Abb. 8:	Tubulysinkonzentration in Kulturbrühen verschiedener Stämme von <i>Archangium gephyra</i> .....	34
Abb. 9:	Zellzahl im Verlauf der Kultivierung von Ar315 mit verschied. Stickstoffquellen ....	35
Abb. 10:	Optische Dichte im Verlauf der Kultivierung von Ar315 mit verschiedenen Stickstoffquellen .....	35
Abb. 11:	Zellzahl, optische Dichte und Tubulysinkonzentration im Verlauf der Schüttelkolbenfermentation von Ar315 in M7Y .....	36
Abb. 12:	Produktion von Tubulysin A durch <i>Archangium gephyra</i> Ar315 mit bzw. ohne XAD-16 im Medium.....	37
Abb. 13:	Plattierungsausbeuten von Ar315 nach 5 Tagen auf verschiedenen Medien .....	38
Abb. 14:	Leistungsverteilung in einer Kolonipopulation von Ar315 und Normalverteilung.	39
Abb. 15:	Tubulysinkonzentrationen nach Kultivierung verschiedener Einzelklone des Ausgangsstammes Ar315 von <i>Archangium gephyra</i> und bester Klon nach UV- Bestrahlung von K4.7 .....	39
Abb. 16:	Produktionsverteilung in einer Kolonipopulation von Ar315 K4.7 nach UV- Bestrahlung und Normalverteilung.....	40
Abb. 17:	Fleckenflächen nach HPTLC von XAD-Extrakten aus Kulturen mit nativen und immobilisierten Zellen von Ar315.....	42
Abb. 18:	Cytotoxizitätstest von XAD-Extrakten von Kulturen mit nativen und mit alginateingehüllten Zellen von Ar315 K3.7. ....	43
Abb. 19:	Phosphatkonzentration im Verlauf der Kultivierung von Ar315 in Ansätzen mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen an $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	44

Abb. 20: Einfluß der eingesetzten Konzentration an $\text{KH}_2\text{PO}_4$ auf die Tubulysinproduktion...	45
Abb. 21: Einfluß des pH-Wertes auf die Tubulysinproduktion in Schüttelkolben.....	46
Abb. 22: Einfluß der Konzentration des Spurenelementcocktails auf die Tubulysinproduktion in den Medien M7Y und M7+ .....	47
Abb. 23: Einfluß einzelner Spurenelemente auf die Tubulysinproduktion .....	47
Abb. 24: Güte der Medienbestandteile im Griechisch-Lateinischen Quadrat I.....	49
Abb. 25: Güte der Medienbestandteile im Griechisch-Lateinischen Quadrat II .....	49
Abb. 26: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von $^{14}\text{C}$ -L-Tyrosin.....	50
Abb. 27: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von $^{35}\text{S}$ -L-Cystein .....	51
Abb. 28: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von $^{14}\text{C}$ -L-Lysin .....	52
Abb. 29: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von $^{14}\text{C}$ -L-Phenylalanin .....	53
Abb. 30: Tubulysinkonzentration nach Kultivierung im Schüttelkolben unter Zugabe von $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Lysin, D-L-Pipecolinsäure, N-Methylpiperidin, L-Tyrosin, L-Cystein, L- Methionin oder L-Isoleucin.....	54
Abb. 31: Tubulysinkonzentration und optische Dichte von Ar315-Kulturen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von L-Tyrosin.....	55
Abb. 32: Tubulysinkonzentration und optische Dichte von Ar315-Kulturen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von L-Lysin .....	55
Abb. 33: Tubulysinkonzentration und optische Dichte von Ar315-Kulturen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von D-L-Pipecolinsäure .....	56
Abb. 34: Aminosäurekonzentrationen des jeweils besten Mediums im Verlauf der Optimierung mit dem Genetischen Algorithmus.....	59
Abb. 35: Tubulysinkonzentration des jeweils besten und des jeweils schlechtesten Mediums im Verlauf der Optimierung mit dem Genetischen Algorithmus .....	60
Abb. 36: Zellzahl im Verlauf der Kultivierung von Ar315 K4.7 unter Zugabe von Glukose, Stärke und Glukose oder ohne zusätzliche C-Quelle.....	61
Abb. 37: Zellzahl im Verlauf der Kultivierung von Ar315 K4.7 unter Zugabe von Stärke, Maltose oder Maltotriose.....	61
Abb. 38: Kohlenhydratkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung von Ar315, I: Stärke- und Konzentration der freien Glukose im Ansatz mit Stärke und Glukose, Konzentration der freien Glukose im Ansatz mit Glukose.....	62
Abb. 39: Kohlenhydratkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung von Ar315, II: Stärkekonzentration im Ansatz mit Stärke, Maltosekonzentration im Ansatz mit Maltose und Maltotriosekonzentration im Ansatz mit Maltotriose.....	63
Abb. 40: Konzentration freier Glukose in Kulturen von Ar315 mit Stärke, Maltose, Maltotriose und im Kontrollansatz. ....	64



Abb. 41: Tubulysingehalt in Ar315- Kulturen mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen. ..64	64
Abb. 42: Sauerstoffübergangsrate und volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient im 6-L-Bioreaktor in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl .....65	65
Abb. 43: Trübungsverlauf im 6-L-Bioreaktor als Maß für den XAD-Abrieb bei unterschiedlichen Drehzahlen.....66	66
Abb. 44: Einfluß der Rührerdrehzahl auf den XAD-Abrieb im 6-L-Bioreaktor .....67	67
Abb. 45: Rührerspitzengeschwindigkeiten im 6-L-Laborbioreaktor und im 300-L-Bioreaktor in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl sowie gewählter Drehzahlbetriebsbereich im Laborbioreaktor und Betriebspunkt im 300-L-Bioreaktor.....67	67
Abb. 46: Korrelation zwischen Probenvolumen und XAD-Volumen der Probe im 6-L-Laborbioreaktor und im Technikumsbioreaktor F350.1 .....68	68
Abb. 47: Rührerdrehzahl und Sauerstoffgehalt im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 55 %.....69	69
Abb. 48: Zellzahl und Tubulysinkonzentration im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 55 %.....70	70
Abb. 49: Rührerdrehzahl und Sauerstoffgehalt im Verlauf der Fermentation von von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 30 %.....71	71
Abb. 50: Zellzahl und Tubulysinkonzentration im Verlauf der Fermentation Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 30 %.....71	71
Abb. 51: Rührerdrehzahl und Sauerstoffgehalt im Verlauf der Fermentation Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 3 %.....72	72
Abb. 52: Zellzahl und Tubulysinkonzentration im Verlauf der Fermentation Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 3 %.....72	72
Abb. 53: Maximale Teilungsrate und Tubulysinkonzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung bei Kultivierung von <i>Archangium gephyra</i> Ar315 im 6-L-Bioreaktor.....73	73
Abb. 54: Rührerdrehzahl und Sauerstoffgehalt im Verlauf der Fermentation von K2.2 ohne Zufütterung .....74	74
Abb. 55: Verbrauch von 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 4 M KOH im Verlauf der Fermentation von K2.2 ohne Zufütterung .....75	75
Abb. 56: Rührerdrehzahl und Sauerstoffgehalt im Verlauf der Fermentation von K2.2 mit Zufütterung von Stärke, Procion und D-L-Pipecolinsäure .....75	75
Abb. 57: Verbrauch von 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 4 M KOH im Verlauf der Fermentation von K2.2 mit Zufütterung von Stärke, Procion und D-L-Pipecolinsäure sowie Fütterungsprofil.....76	76
Abb. 58: Rührerdrehzahl, Sauerstoffgehalt und Zellzahl im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 ohne Zufütterung .....77	77
Abb. 59: Verbrauch von 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 4 M KOH im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 ohne Zufütterung.....77	77
Abb. 60: Rührerdrehzahl, Sauerstoffgehalt und Zellzahl im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 mit Zufütterung von D-L-Pipecolinsäure.....78	78

Abb. 61: Verbrauch von 1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und 4 M KOH im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 mit Zufütterung von D-L-Pipecolinsäure sowie Fütterungsprofil.....	78
Abb. 62: Tubulysinkonzentrationen am Ende der Fermentation von Ar315 K2.2 bzw. Ar315 K3.5 im 4.5-L-Maßstab mit bzw. ohne Fütterung .....	79
Abb. 63: Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert im Verlauf der Fermentation im 15-L-Bioreaktor .....	80
Abb. 64: Wachstumsparameter während der Fermentation von Ar315 K2.2 im 15-L-Bioreaktor; Zelltrockengewicht, optische Dichte und Proteinkonzentration.....	80
Abb. 65: Argyrin- und Tubulysinkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung von Ar315 K2.2 im 15-L-Bioreaktor .....	81
Abb. 66: Zellzahl, Tubulysinkonzentration und Sauerstoffpartialdruck im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.8 im 350-L-Bioreaktor .....	82

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien zur Optimierung der Plattierungsausbeute .....	8
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	9
Tabelle 3: Variationsparameter bei Kultivierungen im 6-L-Bioreaktor .....	12
Tabelle 4: Laufmittel und Säulentypen zur Tubulysinbestimmung mittels HPLC .....	15
Tabelle 5: Medienzusammensetzung der Medien des GLQ-I .....	21
Tabelle 6: Medienzusammensetzung der Medien des GLQ-II.....	22
Tabelle 7: Zusammensetzung der Spurenelementstamlösung.....	23
Tabelle 8: Eingesetzte Aktivitäten bei Einbauversuchen .....	29
Tabelle 9: R <sub>F</sub> -Werte von Tubulysinen.....	31
Tabelle 10: Trennung und Peakschärfe bei HPLC-Läufen zur Tubulysinbestimmung.....	32
Tabelle 11: Tubulysinkonzentrationen der einzelnen Medien im Griechisch-lateinischem Quadrat .....	48
Tabelle 12: Entwicklung der Aminosäuregehalte im Verlauf der Optimierung mit dem Genetischen Algorithmus und resultierende Tubulysinkonzentrationen.....	57

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintri-phosphat
AU	Absorbtionseinheiten
Benz.	Petrolbenzin
c <sub>g</sub> <sup>*</sup>	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase

---

$c_i$	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCAF	Dow Corning Antifoam
GA	genetischer Algorithmus
GLQ	Griechisch-lateinisches Quadrat
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>ention</sub>	entionisiertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HS	Heptansulfonat
K <sub>L</sub> a	volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient
M7 xxx	modifizierte M7-Medien, siehe 2.2.2
MeOH	Methanol
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
NP	Normalphase
OD <sub>nnn</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge nnn
OTR	Sauerstoffübergangsrate
2-PropOH	Isopropanol
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase
RZB	mittlere relative Zentrifugalbeschleunigung
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfat)
tert-BME	tertiär-Butyl-Methyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen



# 1 Einleitung

## 1.1 Myxobakterien

Bei der phylogenetisch abgegrenzten Gruppe der Myxobakterien, die systematisch in der Ordnung Myxococcales zusammengefasst sind, handelt es sich um typische Eubakterien, die aber einige ungewöhnliche Eigenschaften mit sich bringen [63]. Myxobakterien sind 3-6  $\mu\text{m}$  lange, Gram-negative Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,7-1  $\mu\text{m}$ . Sie sind im Boden, auf verrottendem Pflanzenmaterial, Baumrinden und auf Dung zu finden und kommen ubiquitär vor. Eine besondere Eigenschaft der Myxobakterien ist ihre Fähigkeit, sich auf Oberflächen gleitend fortzubewegen. Dabei erreichen sie Geschwindigkeiten von 1-20  $\mu\text{m}/\text{min}$ , womit sie langsamer als begeißelte Bakterien sind. Weiterhin beobachtet man die Ausbreitung von Schwarmkolonien. Die Bakterien bewegen sich vorzugsweise am Rand der Kolonien in Gruppen, also selten isoliert, und breiten sich kreisförmig aus. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Nahrungsmangel, sind die Myxobakterien in der Lage sich aufeinander zu bewegen und Aggregate und daraus Fruchtkörper mit Myxosporen zu bilden. In dieser Form können sie lange überdauern. Fruchtkörperkonserven können nach zehn bis zwanzig Jahren wieder reaktiviert werden. Die Formen der Fruchtkörper sind sehr vielfältig und werden aufgrund ihrer Gattungs- und Artspezifität zur systematischen Einordnung herangezogen. Die Formen reichen von einfachen Erhebungen bis zu gestielten Formen mit reich verzweigt aufgehängten Sporangien. Systematisch teilt man die Myxobakterien in zwei Unterordnungen, die Cystobacterineae und die Sorangineae. In der Unterordnung der Cystobacterineae finden sich schlanke flexible Stäbchen mit spitz zulaufenden Enden. Alle Bakterien dieser Unterordnung sind vom bakteriolytischen Stoffwechseltyp. Durch das Ausscheiden von Enzymen sind sie in der Lage, Proteine, Fette und Nucleinsäuren abzubauen. Die bisher gefundenen Produzenten von Tubulysin gehören der Gattung *Archangium*, *Angiococcus* oder *Stigmatella* an, welche zur Unterordnung der Cystobacterineae gehören. Die Zellen der zweiten Unterordnung, der Sorangineae, sind zylindrische Stäbchen mit abgerundeten Enden. Die Gattung *Sorangium* zeichnet sich zudem durch die Fähigkeit aus, Zellulose abzubauen.

## 1.2 Sekundärmetabolite

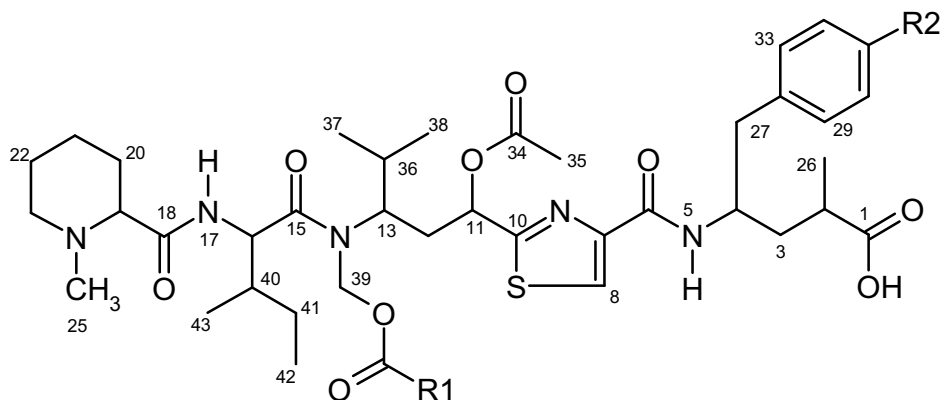
Antibiotika aus Bakterien sind Produkte des Sekundärstoffwechsels. Der Begriff Sekundärstoffwechsel stammt aus der Pflanzenphysiologie und bezeichnet Vorgänge, die für die vegetative Entwicklung des Organismus keine bekannte Bedeutung haben [27]. Weiterhin typisch für Produkte des Sekundärstoffwechsels ist die chemische Variabilität. Einige Strukturen sind oft spezifisch für eine Art, Gattung oder eine andere systematisch abgegrenzte Gruppe. Aber auch innerhalb einer Art tauchen oft Sekundärstoffe in mehreren Strukturvarianten auf. In Bezug auf Mikroorganismen bezeichnet Bu'Lock [12] Sekundärmetabolite als Substanzen, die zeitversetzt nach der Wachstumsphase produziert werden. Allerdings läßt sich diese Aussage nicht generalisieren. So erfolgt beispielsweise die Bildung von Phytotoxinen durch *Alternaria* oder *Fusarium spec.* auch wachstumsassoziiert. Da die Sekundärstoffe für den Primärstoffwechsel keine Bedeutung haben, stellt sich die Frage nach der Funktion, bzw. nach dem Nutzen für die Mikroorganismen. Sicherlich kann die Inhibition des Wachstums von Substratkonkurrenten durch ausgeschiedene Antibiotika ein Vorteil für den Produktionsorganismus sein [17]. Es werden aber auch weitere mögliche Funktionen der Sekundärstoffe diskutiert [83]. Eine für die Produktion von Antibiotika interessante Hypothese ist die Bildung von Sekundärstoffen zum Abbau von Stoffwechselintermediaten in Folge der Anpassung an unterschiedliche Substratmengen. Auf diese Weise würde der Produzent Stoffe ausscheiden, die für andere Mikroben wertlos sind. Diese Hypothese wird gestützt durch die häufige Beobachtung, daß Stoffwechselintermediate als Präkursoren die Bildung von Sekundärstoffen induzieren bzw. steigern [27].

## 1.3 Antibiotika aus Myxobakterien

Im Rahmen eines Screeningprogramms im Bereich Naturstoffe der GBF hat sich herausgestellt, daß Myxobakterien eine reiche Quelle bioaktiver Sekundärstoffe sind [65-67]. In den letzten 24 Jahren wurden um die 80 Strukturen mit mehr als 350 Strukturvarianten beschrieben. Bei den meisten Strukturen handelt es sich um neue Verbindungen, die eine große chemische Variabilität aufweisen. Man findet in Myxobakterien Macrocyclen, Polyether, Peptide, Depsipeptide und Polyene. Auch die Wirkungsmechanismen der myxobakteriellen Antibiotika zeigen eine hohe Variabilität. Man findet Strukturen, die die Atmungskette inhibieren [41, 42, 52-55], Hemmstoffe der ribosomalen Proteinbiosynthese [36, 56, 71] und Hemmstoffe der eubakteriellen RNS-Polymerase [34, 35, 37, 38].

Des weiteren wurden Substanzen mit toxischen Effekten auf tierische und menschliche Zellkulturen gefunden. Diese Substanzen wirken häufig auf das Cytoskelett. Zum einen auf das Aktingerüst, wie das Rhizopodin [30, 70], zum anderen auf die Mikrotubuli, wie das Epothilon [24] oder das Tubulysin. Mikrotubuli haben neben der Formgebung im Cytoskelett weitere Funktionen in der Zelle. So bilden sie Transportbahnen für den intrazellulären Transport von Vesikeln und Organellen. Mikrotubuli sind auch die Hauptkomponenten des Spindelapparates, welcher eine wichtige Aufgabe in der Zellteilung (Mitose/Meiose) spielt. Antimitotische Substanzen sind von großem Interesse, da sich ihre Wirkung vor allem an sich schnell teilenden Tumorzellen zeigt. Neue Strukturen mit antimitotischer Wirkung sind somit mögliche neue Krebs-Therapeutika bzw. Leitstrukturen, aus denen neue Krebs-Therapeutika entwickelt werden können.

Während Epothilone eine stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli haben und somit wie das bereits in der Therapie eingesetzte Taxol wirken [9], beruht die cytotoxische Wirkung des Tubulysins auf einer Destabilisierung der Mikrotubuli, was eher der Wirkung des bekannteren Cytostatikums Dolastatin entspricht [48, 69].



Tubulysin A:  $R1 = CH_2-CH(CH_3)_2$      $R2 = OH$   
 B:  $R1 = CH_2-CH_2-CH_3$      $R2 = OH$   
 D:  $R1 = CH_2-CH(CH_3)_2$      $R2 = H$

**Abb. 1: Chemische Struktur der Tubulysine**

Abb. 1 zeigt die chemische Struktur der Tubulysine [68]. Es handelt sich um Peptide mit teilweise ungewöhnlichen Aminosäuren. So findet man im linken Teil des Moleküls eine N-Methyl-L-pipecolinsäure (Abb. 1; Pos. 18-25), die über eine Peptidbindung mit L-Isoleucin (Abb. 1; Pos. 15-17, 40-43) verknüpft ist. Weiterhin auffällig ist ein ungewöhnliches

L-Tyrosin-Derivat im rechten Teil des Moleküls (Abb. 1; Pos. 4-5, 27-33). An den Positionen 11 und 39 sind organische Säuren über Sauerstoff angeestert, zum einen die Essigsäure (Abb. 1, Pos. 11) zum anderen die Isovaleriansäure (Abb. 1, Pos39, Tubulysin A und D) bzw. die Buttersäure (Abb. 1, Pos39, Tubulysin B). Vorherige Arbeiten haben gezeigt, daß das Methyl-C-Atom (Abb. 1; Pos. 25) an der L-Pipecolinsäure und das C-Atom an Pos. 39 aus Methionin stammen. Durch weitere Einbauversuche konnten Kohlenstoffatome identifiziert werden, die aus Acetateinheiten stammen. Diese finden sich an den Positionen 1-2, 10-11 und 34-35 [32].

Unter den myxobakteriellen Antibiotika gibt es weitere Peptidstrukturen. Das Myxovalargin, ein relativ langkettiges Oligopeptid ( $M = 1677 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), hat eine antibakterielle Wirkung durch Hemmung der Proteinsynthese [36, 39]. Die Vioprolide sind ringförmige Peptolidstrukturen mit antifungischer und cytotoxischer Wirkung, die, wie auch das Tubulysin, die ungewöhnliche Aminosäure L-Pipecolinsäure enthalten [72].

In der Natur werden drei Mechanismen der Peptidbildung realisiert [50, 51]. Das erste Prinzip ist die ribosomale Synthese von linearen Peptiden aus den 20 proteinogenen Aminosäuren. Das zweite Prinzip ist die enzymatische Synthese von linearen Di- und Tripeptiden durch lösliche Enzyme. Das dritte Prinzip ist die enzymatische Synthese von Oligopeptiden durch Multienzymkomplexe. Da die Tubulysinstruktur ungewöhnliche Aminosäuren enthält und aus mehr als drei Aminosäuren besteht, ist die Synthese an einem Multienzymkomplex die wahrscheinlichste Bildungsform.

## 1.4 Produktionsoptimierung

Eine wichtige Rolle in der Produktion spielt der Bakterienstamm. Der isolierte Wildstamm ist häufig kein einheitlicher Genotyp, er spaltet sich bei unterschiedlichen Kulturbedingungen häufig in eine Population unterschiedlicher Klone (Genotypen) auf. Durch eine gezielte Selektion von produktionsstarken Klonen ist es häufig möglich, eine Produktionskultur mit einer höheren Sekundärstoffbildung zu erzeugen. Unter bestimmten Bedingungen bei der Konservierung und Anzucht neigen gerade Leistungsstämme zur genetischen Instabilität (Segregation). Durch eine ständige Erhaltungsselektion ist es aber häufig möglich, eine Degeneration des Stammes zu vermeiden [28]. Neben der Selektion aus dem Wildstamm kann man auch Klone nach der Behandlung mit Mutagenen aus einer Kolonipopulation isolieren. Durch die Behandlung von Zellen mit mutagenen Stoffen wie N-Nitroso-N-methylguanidin, N-Methylsulfonat oder durch Röntgenbestrahlung oder UV-Licht kann man Mutanten mit



veränderter Morphologie, verändertem Produktspektrum oder mit veränderter Produktionsleistung erhalten [13, 29, 43, 44].

Neben dem Stamm sind auch physiologische und physikochemische Faktoren für die Sekundärstoffproduktion von Bedeutung. Die sogenannte Katabolitrepression durch leicht verwertbare Kohlenhydrate führt häufig zu einer verminderten Sekundärstoffproduktion [18, 60, 74]. Als Beispiel sei hier die Produktion von Cephalosporin durch *Streptomyces clavuligerus* genannt. Gut verwertbare Kohlenstoffquellen wie Maltose führen zwar zu einer erhöhten Biomasseproduktion, die Sekundärstoffbildung ist allerdings wesentlich höher, wenn weniger gut verwertbare Kohlenstoffquellen, wie Succinat verfüttert werden [1]. Auch hohe Phosphatkonzentrationen haben häufig reprimierende Effekte auf die Antibiotikumproduktion [28].

In aeroben mikrobiellen Prozessen hat die Sauerstoffsättigung während der Kultivierung häufig einen starken Einfluß. So beobachtete Kaiser eine erhöhte Manumycinproduktion durch *Streptomyces parvulus* bei höheren Sauerstoffkonzentrationen im Medium [45]. Aber auch ein Herabsetzen der Sauerstoffkonzentration kann zu einer erhöhten Sekundärstoffbildung führen [82]. Obwohl die Biomassebildung bei niedriger Sauerstoffzufuhr um 65 % abnahm, beobachtete Kempf eine Erhöhung der Galliderminproduktion durch *Staphylococcus gallinarum* [47].

Bei Sekundärstoffen, die nach der eigentlichen Wachstumsphase produziert werden und damit der Definition von Bu'Lock entsprechen, werden vor allem zwei Gründe für das Einsetzen des Sekundärstoffwechsels genannt. Zum einen kann erst nach dem Aufbrauchen von reprimierend wirkenden Substraten die Produktion der Antibiotika beginnen. Des weiteren wird aber auch die Induktion des Sekundärstoffwechsels durch Vorstufen, die sich im Verlauf der Wachstumsphase akkumuliert haben, beobachtet. Beispiele hierfür sind die Förderung der Ergotalkaloidbiosynthese in *Claviceps*-Stämmen durch die Zugabe von Tryptophan und die Förderung der Bacitracinsynthese bei *Bacillus* durch Aminosäuren.

Ziel dieser Arbeit war es, Möglichkeiten für eine Produktionssteigerung des cytotoxischen Wirkstoffes Tubulysin aufzuzeigen. Einbezogen wurde der Produktionsstamm sowie physiologische und verfahrenstechnische Ansätze.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

Zur Ermittlung eines geeigneten Stammes zur Produktion von Tubulysin A wurden vier verschiedene Stämme des Myxobakteriums *Archangium gephyra* (Ar315, Ar320, Ar332, Ar8080) getestet. Weiterführende Experimente mit *Archangium gephyra* erfolgten mit dem Stamm Ar315 und mit Klonen bzw. Mutanten, die aus diesem erzeugt wurden. Experimente zur Biotransformation von Tubulysin D zu Tubulysin A wurden mit dem Stamm *Angiococcus disciformis* An d26, einem Produzenten von Tubulysin D, durchgeführt. Alle Stämme sind Isolate, die in der Abteilung Naturstoffbiologie der GBF gewonnen wurden.

### 2.2 Kultivierungsmedien und Chemikalien

#### 2.2.1 Standardmedien

Als Standardproduktionsmedium wurde M7+-Nährbouillon verwendet. Die Stammhaltung und die Tubulysinproduktion auf festen Nährböden erfolgte auf VY/2+-Agarplatten. Die Zusammensetzung dieser Medien ist im folgenden aufgelistet.

M7+-Nährbouillon		VY/2+-Agar	
Probion <sup>1</sup>	0,5 %	Bäckerhefe	0,5 %
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,1 %	CaCl <sub>2</sub>	0,1 %
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1 %	Agar	1,8 %
Hefeextrakt	0,1 %	Cyanocobalamin	0,001 %
Stärke, löslich	0,5 %	Glukose·H <sub>2</sub> O	0,2 %
HEPES	1,0 %	pH 7,2	
Cyanocobalamin	0,001 %		
Glukose·H <sub>2</sub> O	0,2 %		
pH 7,4			

---

<sup>1</sup> Einzellerprotein aus *Methylomonas clara*. (siehe auch Abschnitt 2.2.5)

### 2.2.2 Modifizierte M7-Nährbouillons

Auf der Basis des Mediums M7+ wurden modifizierte M7-Nährbouillons hergestellt, indem Bestandteile ersetzt, hinzugefügt bzw. weggelassen wurden.

M7Y:	Probion ersetzt durch 5 g·L <sup>-1</sup> Hefeextrakt (Difco)
M7Yr:	Probion ersetzt durch 2 g·L <sup>-1</sup> Hefeextrakt (Difco); 2 g·L <sup>-1</sup> Stärke
M7C:	Probion ersetzt durch 5 g·L <sup>-1</sup> Casitone (Difco)
M7P:	Probion ersetzt durch 5 g·L <sup>-1</sup> Peptone (Difco)
M7T:	Probion ersetzt durch 5 g·L <sup>-1</sup> Tryptone (Difco)
M7-G:	ohne Glukose
M7-G-SYr	ohne Glukose; ohne Stärke; 0,5 g·L <sup>-1</sup> Hefeextrakt (Difco)
M7tS:	lösliche Stärke ersetzt durch technische Stärke
M7tSrYr:	2 g·L <sup>-1</sup> technische Stärke; 0,5 g·L <sup>-1</sup> Hefeextrakt (Difco)
M7tStH-G:	ohne Glukose; lösliche Stärke ersetzt durch technische Stärke; Difco-Hefextrakt ersetzt durch Hefeextrakt von Fould-Springer
M7tSr-G:	ohne Glukose; lösliche Stärke ersetzt durch 0,2 g·L <sup>-1</sup> technische Stärke

### 2.2.3 Medien zur Optimierung der Plattierungsausbeute

In Tabelle 1 ist die Zusammensetzung der Medien aufgeführt, die zur Optimierung der Plattierungsausbeute verwendet wurden. Bei dem in der Tabelle nicht aufgeführten Medium PM9 handelt es sich um den in Abschnitt 2.2.1 aufgeführten VY/2-Agar. Neben den in Tabelle 1 aufgeführten Bestandteilen enthielten alle Medien 1,8 % Agar und 0,001 % Cyanocobalamin. Der pH-Wert wurde nach dem Autoklavieren auf pH 7,2 eingestellt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien zur Optimierung der Plattierungsausbeute (zusätzliche Bestandteile siehe Fließtext)**

Bezeichnung	Mediumskomponente [%]					
	Casitone	Hefeextrakt	Peptone	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Glukose
PM1	0,5	0,1	-	0,2	0,1	-
PM2	0,2	0,1	-	0,1	0,1	-
PM3	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-
PM4	0,05	0,1	-	0,2	0,1	-
PM5	-	0,2	-	0,1	0,05	-
PM6	-	0,5	-	0,2	0,1	0,2

PM7	0,1	0,5	-	0,2	0,1	-
PM8	-	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1
PM10	-	0,1	0,5	0,1	0,1	-
PM11	-	-	0,5	0,1	0,1	0,1

#### 2.2.4 Medien und Puffer für tierische Zellkulturen

Für die Kultivierung der Maus-Zelllinie L929 und zur Probenverdünnung bei der Analyse des Tubulysingehaltes wurde ‚Dulbecco’s modifiziertes Eagle Medium‘ (DMEM-Pulver, GibcoBRL) mit 10 % ‚New Born Calve Serum‘ (NBCS) verwendet. Für die DAPI-Verdünnung im Cytotoxizitätstest wurde PBS-Puffer verwendet (Dulbecco’s phosphatgepufferte Lösung).

##### Zusammensetzung des PBS-Puffers

CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,9 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,5 mM
NaCl	137,0 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM

#### 2.2.5 Chemikalien

In Tabelle 2 sind die Quellen der verwendeten Chemikalien aufgelistet. Nicht aufgeführte Chemikalien (i.a. Salze und Standardchemikalien) wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Riedel-de-Haën (Seelze) in der Reinheitsstufe ‚zur Analyse‘ oder höheren Reinheitsgraden bezogen.

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

Bezeichnung	Bezugsquelle
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Hefeextrakt, technisch	Fould-Springer, Straßburg, Frankreich
Casitone	Difco, Detroit, USA
Peptone	Difco, Detroit, USA
Tryptone	Difco, Detroit, USA

DCAF-Antischaum	Dow Corning Corp., Midland, MI, USA
D-Glukosetestkit	Boehringer Mannheim
Stärke, löslich	Merck, Darmstadt
Stärke, technisch	Cerestar, Neuilly-sur-Seine Cedex, Frankreich
Procion Me069	Hoechst, Frankfurt
Agar	Oxoid, Hampshire, England

---

## 2.3 Kultivierungsmethoden

### 2.3.1 Schüttelkolbenversuche

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Schüttelkolbenversuche in Erlenmeyerkolben auf einer Schüttelmaschine mit 160 UpM bei 30 °C durchgeführt. Als Inokulum (5%) wurden 2 Tage kultivierte Vorkulturen mit entsprechenden Medien verwendet.

Versuche mit homogenen Medien mit unterschiedlichen Stickstoffquellen, Versuche zur Tubulysinproduktion verschiedener Stämme von *Archangium gephyra*, sowie Versuche zum Wachstums- und Produktionsverhalten erfolgten in Doppelansätzen in 500-mL-Erlenmeyerkolben mit 200 ml Kulturvolumen.

Die Tubulysinproduktion verschiedener Klone von Ar315 wurde in 100-mL-Erlenmeyerkolben mit 20 ml Kulturvolumen (M7+ mit 2 % (v/v) XAD) ermittelt. Die Kolben wurden mit 1,5 cm<sup>2</sup> einer bewachsenen VY/2-Platte angeimpft.

Alle weiteren Schüttelkolbenversuche wurden, sofern nicht anders beschrieben, im 80-mL-Maßstab in 250-mL-Erlenmeyerkolben durchgeführt.

### 2.3.2 Fermentationen im 4,5-L-Maßstab

Die Laborfermentationen wurden in einem 6-L-Bioreaktor (FairMenTec GmbH, Göttingen) bei einem Arbeitsvolumen von 4,5 L durchgeführt. Alle Elemente des Kulturgefäßes incl. der Einbauten waren metallfrei. Das Kulturgefäß aus Glas war mit einem abnehmbaren Doppelmantel zur Temperierung über einen Umlaufthermostat (MV-4, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) ausgestattet. Die Einbauten (4 Strömungsbrecher, Rührerachse incl. 3 Blattrührern mit je 5 Blättern, mechanischer Schaumzerstörer, Zutropf- und Absaugeinrichtungen, Begasungseinrichtung) waren aus dem Kunststoff PEEK gefertigt. Über den Gefäßdeckel war der Bioreaktor mit folgenden Sonden ausgestattet:

pH-Sonde (InPro3000/225, Mettler-Toledo GmbH, Gießen),  
Sauerstoffsonde (D140-B220-PT-D9, Broadley-James Corp. Irvine, CA, USA),  
Temperatursonde (Pt-100, Broadley-James, Irvine, CA, USA).

Der Reaktor wurde über einen drehzahlgeregelten Gleichstrommotor, der über eine Magnetkupplung dichtungsfrei mit der Rührerachse verbunden war, angetrieben. Die Drehzahl konnte zwischen 100 und 2000 UpM eingestellt werden.

Zur Datenaquirierung waren alle Sonden sowie der Motor mit einem Fermentationscontroller FCE03 (FairMenTec GmbH, Göttingen) verbunden. Zur pH-Steuerung (PID-Regelung) waren zwei Peristaltikpumpen (314D, Watson Marlow GmbH, Düsseldorf) am Controller angeschlossen. Die Pumpen dosierten bei Bedarf 3 M KOH bzw. 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> über die Zutropfeinrichtungen in das Kulturgefäß. Außerdem war eine Pumpe (314D, Watson Marlow GmbH, Düsseldorf) zur Zudosierung von Antischaummittel (Dow Corning Antifoam (DCAF), 30%ige Lösung) über den Controller anzusteuern. Der Sauerstoffgehalt wurde über die Rührerdrehzahl geregelt.

Die Prozeßdaten wurden während der Fermentation mit dem Datenübertragungsprotokoll Modbus (Modicon) an einen Personalcomputer übermittelt und dort über die Software InTouch [81] in einer Echtzeitdatenbank gespeichert. Mit Hilfe des Personalcomputers und der Software InTouch konnten außerdem alle Prozeßparameter sowie alle Soll- und Ist-Werte der einzelnen Regler vom Controller eingelesen oder an den Controller übermittelt werden. Auf diese Weise war es möglich, komplexere Regelungsvorgänge, als die im Fermentationscontroller (FCE03) implementierten, zu gestalten.

Die Nachfütterung von Medienbestandteilen in verschiedenen Fermentationen wurde auf diese Weise zu vergleichbaren Wachstumsphasen realisiert. Durch die Programmierung von ‚Condition-Scripts‘ innerhalb der InTouch-Umgebung wurde die Zufütterungspumpe mit einer vorgegebenen Pumprate bei Erreichen eines bestimmten Sauerstoffmeßwertes geschaltet.

Die Probennahme erfolgte über ein Tauchrohr in eine 100-mL-Schottflasche durch Erzeugung eines leichten Überdrucks (0,6 bar) im Reaktor. Das Probengefäß wurde anschließend unter der Flamme eines Brenners gewechselt. Das Tauchrohr wurde vor und nach der Probennahme mit Druckluft über einen Sterilfilter ausgeblasen. Nach Probennahme wurde sowohl das Probenvolumen (40-60 mL) als auch das XAD-Volumen bestimmt. Die Berechnung der

Tubulysin-konzentrationen erfolgte über das XAD-Volumen und wurde pro mL Fermentationsmedium angegeben. Als Nährlösungen dienten modifizierte M7-Medien ohne HEPES-Puffer unter Zugabe von 2 % (v/v) XAD-16. Die lösliche Stärke (Merck) wurde durch eine technische Stärke (pre-gelatinized Starch, Cerestar) ersetzt.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Variations- und Standardparameter der durchgeführten Fermentationen im Labormaßstab.

**Tabelle 3: Variations- und Standardparameter bei Kultivierungen im 6-L-Bioreaktor**

Versuch	pO <sub>2</sub> [%]	Belüftungsrate [vvm]	pH	Temp. [°C]	Grund- medium	Zufütterung	Klon
F1	3	0,05	7,4	30	M7tS	-	K3.5
F2	30	0,1	7,4	30	M7tS	-	K3.5
F3	55	0,5	7,4	30	M7tS	-	K3.5
F4	30	0,1	7,4	30	M7tSrYr	-	K2.2
F5	30	0,1	7,4	30	M7tSrYr	50 g·L <sup>-1</sup> Probion 50 g·L <sup>-1</sup> techn. Stärke 13 g·L <sup>-1</sup> D-L-Pipecolinsäure	K2.2
F6	30	0,1	7,4	30	M7-G-SYr	-	K3.5
F7	30	0,1	7,4	30	M7-G-SYr	13 g·L <sup>-1</sup> D-L-Pipecolinsäure	K3.5

### 2.3.3 Fermentation im 10-L-Maßstab

Die Kultivierung von Ar315 im 10-L-Maßstab erfolgte in einem 15-L-Bioreaktor mit Scheibenrührern (Giovanola) im Technikum der GBF. Als Substrat diente M7+-Medium unter Zugabe von 1% HEPES und 2 % (v/v) XAD-16. Angeimpft wurde mit 500 mL einer 2 Tage alten Vorkultur des Klons K2.2 in M7+. Der pH-Wert wurde vor dem Animpfen auf 7,4 eingestellt, im Verlauf der Fermentation aufgezeichnet, aber nicht geregelt. Der Sauerstoffgehalt im Medium wurde mittels einer polarographischen O<sub>2</sub>-Elektrode registriert. Der Reaktor wurde mit einem Volumenstrom von 0,1 vvm belüftet. Außerdem erfolgte eine Aufzeichnung der Temperatur (Soll-Wert: 30 °C) und Rührerdrehzahl (Soll-Wert: 150 UpM). Zur Bestimmung der Tubulysin- und Argyrinkonzentrationen sowie zur Bestimmung der Zellzahl wurden täglich Proben (Probenvolumen: 100 mL) entnommen.



### 2.3.4 Fermentation im 300-L-Maßstab

Die Kultivierung von *Archangium gephyra* Ar315 K3.8 im 300-L-Maßstab erfolgte in einem 350-L-Bioreaktor mit Scheibenrührer (Giovanola) im Technikum der GBF. Als Substrat diente M7tStH-G (siehe dazu Abschnitt 2.2.2) unter Zusatz von 2 % XAD-16. Angeimpft wurde der 300-L-Ansatz mit 7 L Vorkultur, die ebenfalls im Technikum der GBF in einem 10-L-Ansatz im 15-L-Bioreaktor (Giovanola) kultiviert wurde. Die Vorkultivierung erfolgte ohne pH-Steuerung unter Zugabe von 1 % HEPES in M7tS-G. Außerdem wurde dem Medium 0,5 % einer 30%igen Suspension des Antischaummittels Dow Corning Antifoam (DCAF) zugegeben. Zum Zeitpunkt des Überimpfens betrug die Zellzahl der Vorkultur  $3 \cdot 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$ . Während der Hauptfermentation wurde der pH-Wert an zwei Positionen im Fermentor bestimmt und über einen pH-Controller durch die Zudosierung von 2 M KOH bzw. 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf dem Soll-Wert von  $7,4 \pm 0,1$  gehalten. Die Belüftungsrate im Bioreaktor betrug 0,1 vvm, und die Drehzahl wurde auf 150 UpM voreingestellt. Für die Kontrolluntersuchungen wurden dem Bioreaktor, je nach Wachstumsphase, ein- bis dreimal täglich eine Probe mit einem Probenvolumen von ca. 200 mL  $\pm 30$  mL entnommen.

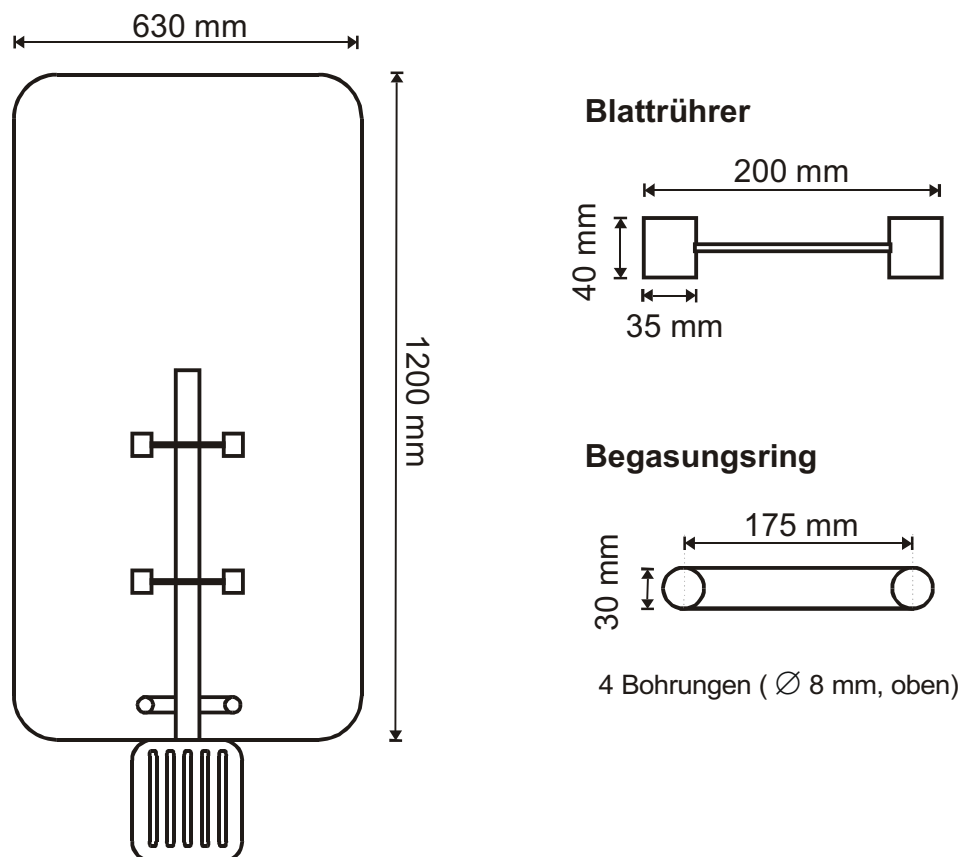


Abb. 2: Dimensionen des 300-L-Bioreaktors (F350.1) mit 2 Blattrührern und Begasungsring

## 2.4 XAD-Eluate

Zur kontinuierlichen Adsorption von lipophilen Metaboliten wurden dem Kultivierungsmedium 2,5 % (v/v) des Adsorberharzes XAD-16 (Rohm und Haas, Frankfurt a.M.) beigelegt. Zur Elution der Metabolite vom Harz wurde die fermentierte Kulturbrühe über ein feinmaschiges Sieb (Maschenweite 250  $\mu\text{m}$ , bei 20-mL-Ansätzen über Schwarzbandfilter) filtriert. Der Filtrerrückstand wurde in Methanol (20 % des Kulturvolumens) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C extrahiert. Anschließend wurde das Eluat über einen Schwarzbandfilter (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) filtriert. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer bzw. in einem Stickstoffverdampfer zur Trockne eingeengt und anschließend in Methanol (1 % bzw. 5 % des Kulturvolumens) aufgenommen.

## 2.5 Klonierung und Mutagenese von Myxobakterien

Zur Erzeugung von Einzelklonen wurden die Zellen in PM4-Flüssigmedium (es entspricht dem Plattierungsmedium PM4 ohne Zusatz von Agar (Zusammensetzung vgl. Abschnitt 2.2.3)) vorkultiviert. Falls die Kultur klumpiges Wachstum zeigte, wurde sie wiederholt in PM4-Flüssigmedium überimpft, bis sie homogen wuchs. Alle Zellen waren so mikroskopisch deutlich voneinander getrennt. Nach geeigneter Verdünnung wurden die Zellen auf PM4-Medium ausplattiert und 2 Wochen bei 30 °C kultiviert.

Die Anzucht der Zellen zur Mutagenese erfolgte ebenfalls in PM4-Flüssigmedium. Eine drei Tage alte Kultur wurde im gleichen Medium auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot \text{mL}^{-1}$  verdünnt. 15 ml der verdünnten Zellsuspension wurde in einen Mikrotiterplattendeckel überführt, geschüttelt und 50 s mit einer UV-Lampe bei 254 nm in einem Abstand von 10 cm bestrahlt. Unter diesen Bedingungen wurde eine Abtötung von 99 - 99,9 % erzielt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen 100 mL-Erlenmeyerkolben überführt und im Dunkeln über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Die so behandelten Zellen wurden auf PM4 ausplattiert und 2 Wochen kultiviert.

Die gewachsenen Einzelklone wurden in 2 Stufen auf ihre Tubulysinproduktion getestet. Zunächst wurden die Einzelklone mit sterilen Zahnstochern in einzelne Vertiefungen einer Kulturplatte mit 24 Näpfen, die mit VY/2-Agar gefüllt waren, übertragen. Nach einer Kultivierungsdauer von 2 Wochen wurden aus den Wells Agarzylinder ( $V = 425 \mu\text{L}$ ) ausgestochen und zur Tubulysinextraktion über Nacht in 1,5-mL-Reaktionsgefäße mit 200  $\mu\text{L}$  Methanol gegeben. Die so gewonnenen Extrakte wurden im Cytotoxizitätstest II (siehe Abschnitt 1.1.3) auf ihren Tubulysingehalt getestet.

Als Variante wurden die Einzelklone nicht in 24-Well-Mikrotiterplatten, sondern in 96-Well-Platten übertragen. Die Tubulysinextraktion erfolgte dann direkt in den Platten, indem die mit 160  $\mu\text{L}$  Agar gefüllten Wells mit 80  $\mu\text{L}$  Methanol überschichtet wurden. Die Extrakte wurden wie auch in der im vorherigen Absatz beschriebenen Variante im Cytotoxizitätstest II auf ihre Tubulysinkonzentration getestet.

Die Klone, die sich im Cytotoxizitätstest als gute Produzenten herausstellten, wurden auf ihre Tubulysinproduktion im 20-mL-Maßstab in M7+-Medium unter Zugabe von XAD (2 %, v/v) untersucht.

## 2.6 Analysemethoden

### 2.6.1 HPLC zur Tubulysinbestimmung

Zur Bestimmung des Tubulysingehaltes in Kulturüberständen wurde eine Reihe von verschiedenen HPLC-Bedingungen getestet. Die HPLC-Anlage setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

HPLC-Anlage:	HEWLETT PACKARD
Säulen:	RP1: Macherey-Nagel Nucleosil 125-5 C18 RP2: Macherey-Nagel Nucleosil 250-7,5 C8 NP: Macherey-Nagel Nucleosil 250-7,5
Fließrate:	1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Detektion:	Diodenarray

Für die unterschiedlichen Säulentypen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Laufmittel verwendet. Jeder Lauf wurde zunächst mit einem Tubulysin-A-Standard (1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , Injektionsvolumen 10  $\mu\text{L}$ ) und anschließend mit einem XAD-Extrakt von Ar315 (100-fach konz., 5  $\mu\text{L}$ ) durchgeführt.

**Tabelle 4: Laufmittel (vgl. Abkürzungsverzeichnis) und Säulentypen zur Tubulysinbestimmung mittels HPLC**

Lauf	Säule	Laufmittel	Ionenpaarzusatz
1	RP1	MeOH/H <sub>2</sub> O 70/30 + NH <sub>4</sub> Ac 2 mM pH5	-
2	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50 + 0,1 % TFA	SDS 10 mM
3	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 50/50 + 0,1 % TFA	HS 10 mM
4	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 40/60 + 0,075 % TFA	HS 7,5 mM

5	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 40/60 + 0,1 % TFA	HS 2 mM
6	RP2	ACN/H <sub>2</sub> O 45/55 + 0,1 % TFA	HS 10 mM
7	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 45/55 + 0,1 % TFA	HS 12 mM
8	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 45/55 + 0,1 % TFA	HS 15 mM
9	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 45/55	HS 7,5 mM
10	NP	tert-BME/Benz. 2/1 + 15% MeOH	-
11	NP	tert-BME/Benz. 4/1 + 10% MeOH + 0,5 % TFA	-
12	NP	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 90/10 + 0,5 % TFA	-
13	RP1	THF/H <sub>2</sub> O 40/60	-
14	RP1	ACN/H <sub>2</sub> O 45/55 + NH <sub>4</sub> Ac 50 mM pH5	HS 12 mM
15	RP1	2-PropOH/H <sub>2</sub> O 50/50	HS 12 mM
16	RP1	2-PropOH/ H <sub>2</sub> O 35/65	HS 8,5 mM
17	RP1	2-PropOH/ H <sub>2</sub> O 35/65 + 0,5 % TFA	HS 8,5 mM

### 2.6.2 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Fertigglasplatten 200×200 mm bzw. auf HPTLC-Fertigglasplatten 100×100 mm (Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub>). Pro DC/HPTLC-Platte wurden sieben Proben und drei Standards 20 mm bzw. 10 mm vom unteren Plattenrand und mit einem seitlichen Abstand von 18 mm bzw. 9 mm punktförmig aufgetragen. Die Standards hatten eine Konzentration von 0,5 - 5 µg/Fleck. Die Platten wurden in einer mobilen Phase aus Dichlormethan/Methanol (9/1) entwickelt und anschließend in einem Dünnschichtscanner (High Speed TLC-Scanner CS-920, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert.

Für jede Dünnschichtplatte wurde mit Hilfe der eingesetzten Standards eine Kalibrations-Ausgleichsgerade erstellt. Sie beschreibt die Beziehung zwischen der vom DC-Scanner ausgebenen Fläche und der eingesetzten Tubulysinkonzentration. Die Tubulysinkonzentration der Proben wurde jeweils über die Gleichung der Ausgleichsgeraden berechnet.

Für die qualitative Analyse konnte neben dem R<sub>F</sub>-Wert im direkten Vergleich mit dem Standard auch ein UV-Spektrum herangezogen werden. Für die Bestimmung von UV-Spektren einzelner Flecken einer Dünnschichtplatte wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurde die Silica-Schicht im Bereich des zu untersuchenden Flecks von der Glasträgerplatte

abgekratzt. Die adsorbierten Substanzen wurden mit Methanol eluiert und in einem UV-Spektrometer (UV-1, Unicam/Nicolet Instrument GmbH, Offenbach am Main) im Bereich von 200–400 nm analysiert. Zum anderen wurde ein Spektrum direkt auf der Dünnschichtplatte bestimmt. Dazu wurde der Meßkopf des Dünnschichtscanners (Shimadzu CS-920) über den zu untersuchenden Fleck bewegt. Die Wellenlänge wurde manuell in 5-nm-Schritten im Bereich von 200–400 nm verstellt und das jeweilige Signal (Primärsignal vor geräteinterner Berechnung) aufgezeichnet.

### 2.6.3 Cytotoxizitätstest zur Tubulysinbestimmung

#### Cytotoxizitätstest I:

Die Tubulysinkonzentration in den Kulturbrühen bzw. in den XAD-Eluaten wurde durch einen Cytotoxizitätstest in 96er-Mikrotiterplatten ermittelt. In der Testplatte wurden Mausfibroblasten der Zelllinie L929 ( $50\,000\text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in  $120\,\mu\text{l}$  DMEM + 10 % NBCS über drei Tage vorkultiviert. In die Vertiefungen dieser Testplatte wurden  $60\,\mu\text{l}$  der in einer seriellen Reihe verdünnten Proben gegeben. Nach drei Tagen Inkubation ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 10 %  $\text{CO}_2$ ) erfolgte eine DAPI-Färbung der DNS (abgeändert nach Vollenweider [75]) nach folgendem Schema:

- 1.) Ausschlagen der Testplatte über Zellstoff (Verringerung des Überstandvolumens auf ca.  $60\,\mu\text{l}$ )
- 2.) Aufgabe von  $100\,\mu\text{l}$  Ethanol 50% (v/v) und 30 min Inkubation bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.) Erneutes Ausschlagen der Testplatte
- 4.) Aufgabe von  $50\,\mu\text{l}$  DAPI-Lösung ( $1\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PBS) und 10 min Inkubation bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Auswertung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie (400-fache Vergrößerung; Axiovert 35 Auflichtmikroskop, Zeiss). Die Wirkung von Tubulysin zeigte sich in der veränderten Zellmorphologie und in der Wirkung auf die Zellkerne. Die Mausfibroblasten erschienen größer und abgeflachter. Die Zellkerne zeigten typisch apoptotisches Verhalten [21]. Der Kern war fragmentiert, so daß mehrere Kernfragmente im Zellumen zu erkennen waren. Häufig waren die Kernfragmente ringförmig angeordnet.

Im Vergleich mit einem ebenfalls untersuchten Tubulysinstandard konnte durch Multiplikation mit dem Gesamtverdünnungsfaktor die Tubulysinkonzentration in der Probe ermittelt werden.

### Cytotoxizitätstest II:

Die Variante II der Toxizitätsbestimmung unterschied sich im Vergleich zur Variante I) nur in folgendem Detail: Die zu untersuchenden Proben wurden zu Beginn der Kultivierung direkt zu den Zellen gegeben. Die Vorkultivierung von drei Tagen entfiel somit.

### 2.6.4 Bestimmung von *o*-Phosphat

Die Bestimmung des Phosphatgehalts in Kulturüberständen bzw. in Medien erfolgte spektrophotometrisch [14].

#### **Zusammensetzung der Reagenzlösung zur Bestimmung von Phosphat:**

2 mL	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10 N)
2 mL	Ammoniummolybdat-Lösung (2,5 %)
2 mL	Ascorbinsäure (10 %)
12 mL	H <sub>2</sub> O <sub>ention.</sub>

Für den Test wurden 1000 µL der täglich frisch angesetzten Reagenzlösung mit 100 µL Probe (gegebenenfalls geeignet verdünnt) vermischt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extinktionsmessung bei 820 nm (Ultraspec plus 4054 - Spektrophotometer, LKB-Biochrom, Camebridge, England). Unter gleichen Bedingungen wurde eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen (0,1 - 1 mM) an KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> erstellt. Der Phosphatgehalt der Probe konnte durch Einsetzen in die Gleichung der durch lineare Regression erhaltenen Ausgleichsgeraden ermittelt werden.

### 2.6.5 Zellzahlbestimmung und optische Dichte

Die Zahl an Myxobakterien pro Volumeneinheit in Flüssigkulturen wurde nach geeigneter Verdünnung durch direktes Auszählen in einer Zählkammer nach Neubauer (Kammertiefe 0,01 mm) ermittelt.

Die optische Dichte der Flüssigkulturen wurde in einem Spektrophotometer (551S, Perkin-Elmer GmbH, Überlingen) bei einer Wellenlänge von 620 nm ermittelt.

## 2.7 Zellernte und Zellaufschluß

Zur Ermittlung des intrazellulären Tubulysingehaltes wurde die Zellen durch Zentrifugation (RZB = 3800 g; Sorvall RC5C Zentrifuge mit Rotor GSA, Du Pont GmbH, Bad Homburg)

vom Kulturmedium (100 mL) getrennt. Der Zellrückstand wurde in 40 mL Methanol resuspendiert, 1 h gerührt und erneut zentrifugiert (RZB = 5000 g). Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen, 1 h gerührt und in einem letzten Zentrifugationsschritt vom Lösungsmittel getrennt (RZB = 5000 g). Die Lösungsmittelüberstände wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer evaporiert und der Rückstand in 1,5 mL Methanol aufgenommen.

### 2.7.1 Zuckerbestimmung mittels HPLC

Zur Konzentrationsbestimmung von Glukose, Maltose und Maltotriose in der Fermentationsbrühe wurden die Kulturproben zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5402), und nötigenfalls zum Entfernen von Partikeln mit 0,2 µm Spritzenfilter filtriert und geeignet verdünnt. Die Proben wurden in einer HPLC-Anlage mit folgender Konfiguration analysiert:

HPLC-Pumpe:	Gyncotec Model 300C
Säule:	Shodex sugar-column Ionpak KS-801; temperiert auf 80 °C
Laufmittel:	H <sub>2</sub> O <sub>ention</sub>
Fließrate:	0,75 mL·min <sup>-1</sup>
Detektion:	Refraktometer Sicon Analytic LCD201
Integration:	Gyncotec Integrator C-R6A

Durch die Analyse von Standards konnten zum einen die Retentionszeiten der verschiedenen Zucker, zum anderen die Beziehung zwischen den vom Integrator ermittelten Peakflächen und den eingesetzten Zuckerkonzentrationen ermittelt werden. Proben mit Konzentrationen von weniger als 0,25 g·L<sup>-1</sup> Glukose, bzw. 0,1 g·L<sup>-1</sup> Maltose konnten mit dieser Methode nicht analysiert werden. Die Zuckerkonzentrationen dieser Proben wurden enzymatisch bestimmt (siehe dazu Abschnitt 2.7.2).

### 2.7.2 Enzymatische Zucker- und Stärkebestimmung

#### 2.7.2.1 Glukose-Makrotest

Die enzymatische Glukosebestimmung erfolgte nach der Hexokinasemethode mit einem D-Glukosetestkit. Abweichend zur Anweisung im Packzettel des Testkits wurde die Analyse in Halbmikro-Einwegküvetten angesetzt. In die Küvetten wurden 0,5 mL einer gepufferten NADP/ATP-Lösung (Lösung 1 im Testkit) pipettiert. Dazu wurden 50 µL einer geeignet verdünnten Probe und 950 µL H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st gegeben und gemischt. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 10 µL einer Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Suspension (Suspension 2 im Testkit) gestartet. Vor dem Start der Reaktion und nach 15 min wurde die

Extinktion bei 340 nm gemessen (UV-1, Unicam/Nicolet Instrument GmbH, Offenbach am Main). Von dem Extinktionswert nach der Reaktion wurde der Extinktionswert vor der Reaktion und ein Blindwert (Reaktionsansatz ohne Probe) abgezogen. Neben den Proben wurden auch Glukosestandardlösungen im Bereich von 0,1 bis 2,5 g·L<sup>-1</sup> getestet, wodurch eine Kalibrierungskurve erstellt wurde, welche die Beziehung zwischen den Extinktionswerten und der Glukosekonzentration darstellte. Bei Glukosekonzentrationen in der Probe, die kleiner als 0,1 g·L<sup>-1</sup> waren, wurde der Testansatz mit erhöhtem Probenvolumen bei entsprechender Verringerung des Wasseranteils in der Küvette wiederholt.

#### 2.7.2.2 Glukose-Mikrotest

Bei hohem Probenaufkommen erfolgte die enzymatische Glukosebestimmung in 96er-Mikrotiterplatten (Falcon). Die Basis für diesen Test bildete wie in Abschnitt 2.7.2.1 ein D-Glukosetestkit. Durch folgende Veränderungen der Testanweisung des Packzettels wurde die notwendige Volumenreduktion von 3 mL auf 200 µL erzielt. In die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden 70 µL einer gepufferten NADP/ATP-Lösung (Lösung 1 im Testkit), 30 µL Probe und 80 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> pipettiert und gemischt. Anschließend wurde eine erste Extinktion bei 340 nm in einem Mikrotiter-Spektrometer (Titer-tek Multiscan MTT/340, ICN) gemessen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer verdünnten Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Suspension (Suspension 2 im Testkit, unmittelbar vor dem Test 1:15 verdünnt mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) gestartet. Nach 15 min wurde eine zweite Extinktion bei 340 nm gemessen. Neben den Proben wurden auch hier Glukosestandardlösungen analysiert. Die Berechnung der Glukosekonzentrationen aus den Extinktionswerten erfolgte wie in Abschnitt 2.7.2.1.

#### 2.7.2.3 Stärke-Mikrotest

Die enzymatische Stärkebestimmung erfolgte indirekt über die Analyse von D-Glukose nach enzymatischem Abbau der Stärke. Dazu wurden 130 µL 50 mM Citratpuffer pH 4,6 und 50 µL Probe (geeignet verdünnt) in die Vertiefungen einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde der enzymatische Stärkeabbau durch die Zugabe von 20 µL Amyloglukosidaselösung (5 mg·L<sup>-1</sup>, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Mikrotiterplatte wurde mit Hilfe einer Siegelfolie (Dynex Technol. GmbH, Denkendorf) verschlossen und 15 min in einem Brutschrank bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung bei 80 °C im Brutschrank. Die Ansätze wurden dann zentrifugiert (Sigma 4K) und als Probe in den Glukose-Mikrotest übertragen. Neben den Proben wurden auch Stärkestandardlösungen im



Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2 g·L<sup>-1</sup> analysiert, um eine Kalibrierungsgerade zu erstellen. Zur Ermittlung des Stärkegehalts wurde die Glukosekonzentration in der Probe vor dem enzymatischen Stärkeabbau von dem Glukosegehalt nach dem Abbau abgezogen.

## 2.8 Medienoptimierung

### 2.8.1 Griechisch-Lateinisches Quadrat (GLQ)

Zur Wahl von geeigneten Komponenten für das Produktionsmedium wurden für verschiedene Komponentengruppen unterschiedliche Bestandteile getestet. Nach Auden [4] ergaben sich pro Versuchsreihe bei vier Gruppen (A-D) mit je drei Einzelkomponenten neun verschiedene Medien (M1-M9), die je in Doppelansätzen in Schüttelkulturen (80 mL in 250-mL-Erlenmeyerkolben) auf ihre Eignung zur Tubulysinproduktion mit Ar315 getestet wurden. In Tabelle 5 und Tabelle 6 ist die Zusammensetzung der verschiedenen Medien für die zwei durchgeführten Versuchsreihen aufgeführt. In der Gruppe D des GLQ-I (Tabelle 6) wurde nicht die Komponente variiert, sondern die Konzentration eines Salzgemisches, das zu gleichen Teilen aus MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O und CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O bestand.

**Tabelle 5: Medienzusammensetzung [% (w/v)] der Medien des GLQ-I. Erläuterungen siehe Fließtext**

Code	Komponente	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
A1	Stärke	0,40			0,40			0,40		
A2	Glukose		0,40			0,40			0,40	
A3	Saccharose			0,40			0,40			0,40
B1	Probion	0,50	0,50	0,50						
B2	Bäckerhefe				0,50	0,50	0,50			
B3	Soja-Mehl							0,50	0,50	0,50
C1	Hefeextrakt	0,10					0,10		0,10	
C2	Peptone		0,10		0,10					0,10
C3	Casitone			0,10		0,10		0,10		
D1	Salzkonz. 1	0,05				0,05				0,05
D2	Salzkonz. 2			0,10	0,10				0,10	
D3	Salzkonz. 3		0,20				0,20	0,20		

**Tabelle 6: Medienzusammensetzung [% (w/v) bzw. pH-Wert] der Medien des GLQ-II.**  
**Erläuterungen siehe Fließtext**

Code	Komponente	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
A1	Laktose	0,40			0,40			0,40		
A2	Maltose		0,40			0,40			0,40	
A3	Dextrin			0,40			0,40			0,40
B1	Fischmehl	0,50	0,50	0,50						
B2	Milchpulver				0,50	0,50	0,50			
B3	Erdnußmehl							0,50	0,50	0,50
C1	L-Tyrosin	0,10					0,10		0,10	
C2	L-Cystein		0,10		0,10					0,10
C3	Tyr+Cys			0,10		0,10		0,10		
D1	pH 6,5	pH 6,5				pH 6,5				pH 6,5
D2	pH 7,0			pH 7,0	pH 7,0				pH 7,0	
D3	pH 7,5		pH 7,5				pH 7,5	pH 7,5		

Zur Auswertung und Bestimmung der Güte der einzelnen Mediumskomponenten wurden jeweils die Tubulysinkonzentrationen der neun Medien bestimmt. Aufgrund der Kombination ist jede Einzelkomponente in drei der neun Medien vorhanden. Die Güte der Komponente und damit ihre Eignung für das Produktionsmedium ergibt sich aus der Summe der Tubulysinkonzentrationen der drei Medien.

### 2.8.2 Phosphatgehalt

Um den Einfluß von *o*-Phosphat zu ermitteln, wurde M7P-Medium (siehe Abschnitt 2.2.2) mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 80-mL-Doppelansätzen mit Ar315 beimpft. Der Phosphatgehalt im Medium wurde täglich nach Chen et al. bestimmt (Abschnitt 2.6.4). Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen wurde der Tubulysingehalt in den XAD-Extrakten mittels Dünnschichtchromatographie und mittels Cytotoxizitätstest I bestimmt.

### 2.8.3 Spurenelemente

Zur Untersuchung des Einflusses von Spurenelementen auf die Tubulysinproduktion wurde Kulturen von Ar315 in M7+ und M7Y-Medien (Zusammensetzung siehe 2.2.2) ein Spurenelementcocktail (Zusammensetzung siehe Tabelle 7) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Spurenelementestammlösung**

Salz	Konzentration [mg·L <sup>-1</sup> ]	Salz	Konzentration [mg·L <sup>-1</sup> ]
MnCl <sub>2</sub>	100	SnCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	20
CoCl <sub>2</sub>	20	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
CuSO <sub>4</sub>	10	KBr	20
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	10	NaI	20
ZnCl <sub>2</sub>	20	EDTA, NaFe <sup>3+</sup>	8
LiCl	5		

Neben der Zugabe des Spurenelementcocktails wurde gezielt der Einfluß von Mangan (Zugabe von MnCl<sub>2</sub> 0,1 mg·L<sup>-1</sup>) und von Zink (Zugabe von ZnCl<sub>2</sub> 0,02 und 0,1 mg·L<sup>-1</sup>) untersucht.

#### 2.8.4 Genetischer Algorithmus

Die Optimierung der Aminosäurezusammensetzung im Produktionsmedium wurde mit Hilfe eines genetischen Algorithmus durchgeführt. Für alle notwendigen Berechnungen wurden die Software GALOP [59] verwendet. Bei dieser Methode wurde eine ‚Population‘ von Medien erzeugt, die auf ihre Tubulysinproduktion mit *Archangium gephyra* getestet wurde. Hauptsächlich die besten dieser ersten Generation von Medien wurde zur Erzeugung einer Tochtergeneration verwendet. Von dieser neuen Generation wurde erneut die Güte bestimmt und zur Erzeugung einer neuen Mediengeneration verwendet. Diese Iteration wurde bis zu einer zufriedenstellenden Tubulysinproduktion durchgeführt.

Bei der Erzeugung der Tochtergenerationen kommen verschiedene ‚genetische Operatoren‘ wie Selektion, Mutation, Crossover analog zum natürlichen Vorbild zum Einsatz. Um diese Operatoren auf Schüttelkolbenexperimente übertragen zu können, mussten die zu variierenden Parameter kodiert werden. Ein Individuum (ein Medium) bestand aus den vier zu variierenden Aminosäuren D-L-Pipecolinsäure, L-Tyrosin, L-Cystein und L-Isoleucin. Jede Aminosäurekonzentration wurde in einen linearen Bit-String kodiert. Die Konzentration wurde in 201 Stufen variiert, wodurch eine Bit-String-Länge von 8 bit ( $2^8 = 256 > 201$ ) pro Aminosäure resultierte. Ein einzelnes Individuum hatte so eine Genom-Länge von 32 bit wobei jeweils eine Gruppe von 8 bit einen Mediumbestandteil definiert.

Die Größe der Population wurde auf 8 Individuen pro Generation festgelegt. Jedes Experiment wurde zum Test der Reproduzierbarkeit doppelt angesetzt, wodurch sich pro Generation 16 Kulturkolben ergaben. Zur Bestimmung der Güte der einzelnen Medien wurde die Tubulysinkonzentration aus XAD-Eluaten bestimmt. Diese wurde als einziges Gütekriterium herangezogen. Die Medienzusammensetzung der ersten Generation wurde durch Zufall bestimmt.

### *Selektion*

Die Erzeugung der Tochtergenerationen erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden Medien aus der Muttergeneration selektiert. Dazu wurden aus 8 Medien 8 zufällig ausgewählt, wobei die Chance zur Selektion eines Mediums proportional zu seiner Güte, also seiner Tubulysinkonzentration war. Ein Medium, welches zu einer hohen Tubulysinkonzentration führte, wurde also eher selektiert als ein schlechtes Medium. Durch diese Art der Auswahl können einige Medien häufiger als einmal selektiert werden. Im folgenden Schritt wurden die selektierten Medien aber modifiziert, so daß in der Tochtergeneration Medien nicht mehrfach getestet wurden. Das jeweils beste Medium einer Generation wurde direkt, ohne weitere Schritte in die Tochtergeneration übernommen.

### *Crossover*

Die Bit-Strings der selektierten Medien wurden nun paarweise einer Modifikation unterworfen. Dazu wurden je zwei Bit-Strings zufällig ausgewählt und an der gleichen zufällig ausgewählten Stelle geschnitten und anschließend vertauscht wieder zusammengeführt. Auf diese Weise wurden Eigenschaften von je zwei Medien (aufgrund der Selektion hauptsächlich Medien, die zu einer hohen Tubulysinkonzentration führten) vermischt. Die Wahrscheinlichkeit für ein Crossover wurde auf 0,95 gesetzt, wodurch es in seltenen Fällen auch möglich war, daß Medien nicht modifiziert in die nächste Generation übertragen wurden.

### *Mutation*

Als letzten Schritt zur Erzeugung der Tochtergenerationen wurden Punktmutationen eingeführt. Mit einer Mutationswahrscheinlichkeit von 0,01 wurden einzelne Bits des Bitstrings von 0 auf 1 bzw. von 1 auf 0 gewechselt.

Die mit diesen drei Schritten erzeugten Bit-Strings wurden für den experimentellen Test dekodiert, also wieder in Konzentrationsangaben übersetzt. Im folgenden sind nun die Details der experimentellen Durchführung zusammengefaßt:

**Grundmedium:**

Angaben für 600 mL Vorlage (entspricht 1000 mL Medium)

4 g Probion	1,0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
2 g Stärke	0,5 g Hefeextrakt
1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	12,0 g HEPES
600 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{ention}}$	

pH auf 7,8 vorgestellt (durch Zugabe von 0,2% HCl resultierte pH 7,4)

**Variationsparameter:**

D-L-Pipecolinsäure	0-1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
L-Tyrosin	0-1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
L-Cystein	0-1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
L-Isoleucin	0-1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

**Stammlösungen:**

10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (in 0,2% HCl)
10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

**Versuchsdesign:**

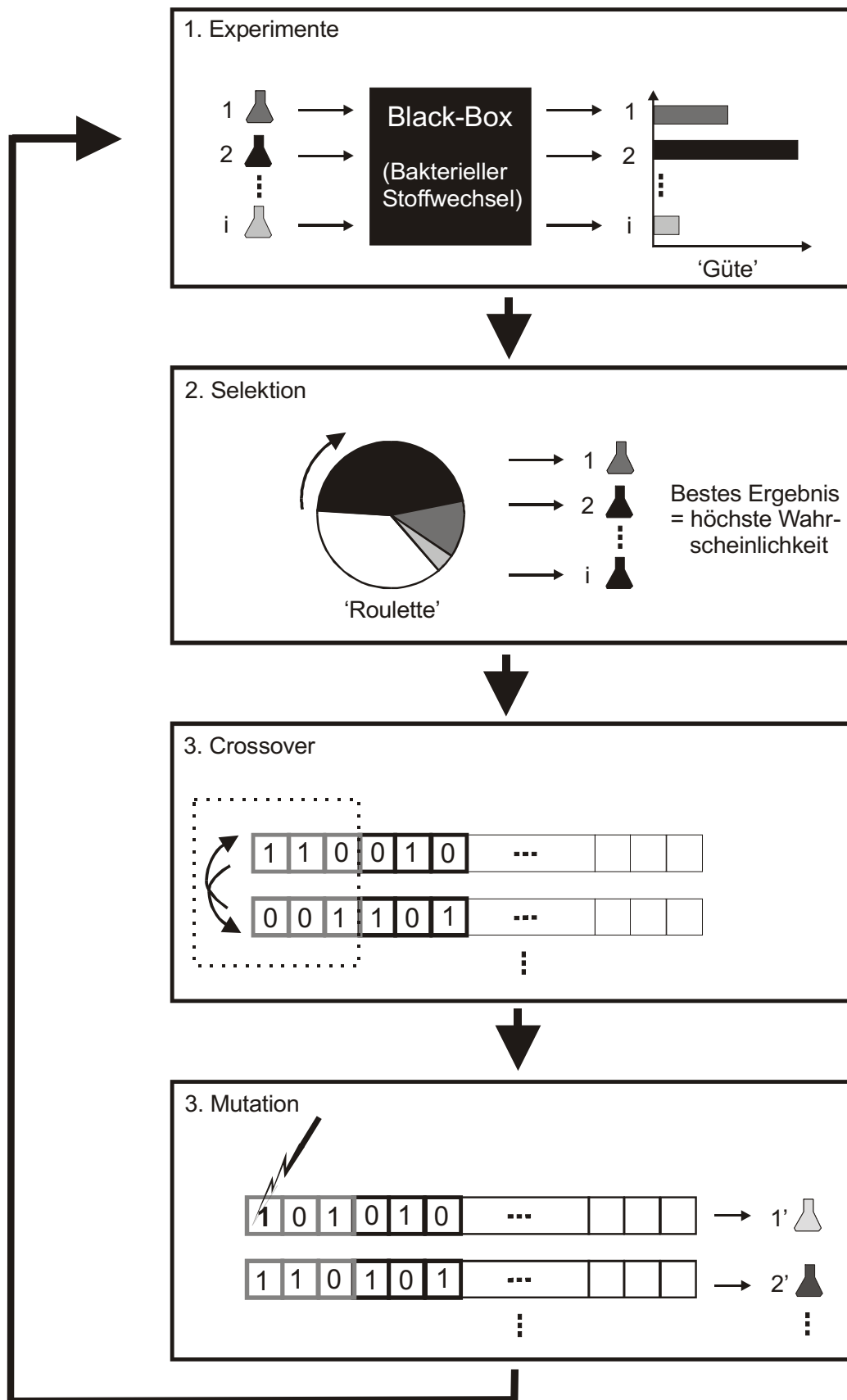
2×8 100-mL-Kolben mit insgesamt 20 mL Medium+2 % XAD

Zusammensetzung:

12 mL Grundmedium

+ jeweils 0-2000  $\mu\text{L}$  Aminosäurestammlösung

aufgefüllt auf 20 mL mit 0,2% HCl und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ention}}$



**Abb. 3: Ablaufschema des Genetischen Algorithmus zur Medienoptimierung (verändert nach Freyer und Botz [23])**

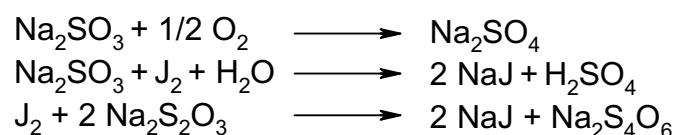
## 2.9 Immobilisierung von Myxobakterien

Die Immobilisierung der Myxobakterien erfolgte durch Einhüllung in das natürliche Polymer Alginat [31]. Dazu wurde eine 2 Tage alte Zellsuspension von *Archangium gephyra* Klon 3.7 abzentrifugiert und in 1/20 des Kulturvolumens resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde für den Vergleich von freien Zellen und immobilisierten Zellen zurückgehalten. Der zweite Teil der Zellsuspension wurde mit einer Polymerlösung aus Na-Alginat in Wasser vermischt. Die Endkonzentration des Alginats betrug 3 % (w/v). Anschließend wurde die Polymerlösung über 20-mL-Einwegspritzen ohne Kanüle und ohne Stempel in ein Härungsbad (2 % (w/v)  $\text{CaCl}_2$ ) getropft. Die dabei entstandenen Kugeln verblieben zur ionotropen Gelbildung 60 min im gerührten Härungsbad. Anschließend wurden sie über ein feinmaschiges Sieb abfiltriert und als Inokulum verwendet. Die so hergestellten Kugelimmobilisate hatten einen Kugeldurchmesser von  $4,37 \pm 0,14$  mm. Ein Gramm Kugeln enthielt Zellen aus 6,6 mL Ausgangsvorkultur.

Zum Vergleich der nativen mit den immobilisierten Zellen wurden 6×2 250-mL-Kolben mit M7+-Medium angesetzt. 3×2 Kolben wurden mit freien Zellen, die anderen 3×2 Kolben mit Alginatimmobilisaten angeimpft. Die Ansätze wurden mit 2,5 %, 5 % bzw. 10 % des Volumens der Ausgangskultur angeimpft.

## 2.10 Sauerstoffübergangsrate

Die Bestimmung der Sauerstoffübergangsrate und des  $K_{La}$ -Wertes erfolgte durch die Sulfitoxidationsmethode [33, 62]. Der 6-L-Bioreaktor wurde mit 5 L eines künstlich sauerstoffverbrauchenden Systems aus einer 0,25 M Na-Sulfit-Lösung unter Zusatz von 1 mM  $\text{CuSO}_4$  als Katalysator befüllt. Unter jeweils konstanten Bedingungen (Temperatur 30 °C; Begasung 1,2 vvm; Rührerdrehzahl 0-1080  $\text{min}^{-1}$ ) wurden Proben im Abstand von einer halben Stunde entnommen und deren Restsulfit-Gehalt jodometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proben in 35 mL Jodreagenz (25 mL 0,2 n  $\text{J}_2$ -Lösung + 10 mL 0,1 n HCl + 5 Tropfen 10 %ige Stärkelösung) pipettiert und anschließend mit einer 0,1 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert. Aus der Differenz des verbrauchten Thiosulfates zwischen zwei Zeitpunkten wurde die Sauerstoffübergangsrate (OTR) nach folgenden Reaktionsgleichungen errechnet.



Aus der Sauerstoffübergangsrate konnte dann aus den folgenden Gleichungen der volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient ( $K_L a$ ) berechnet werden.

$$\text{OTR} = K_L a (c^* - c_l)$$

OTR: Sauerstoffübergangsrate  
 $K_L a$ : volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient  
 $c_l$ : Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase  
 $c^*$ : Sauerstoffsättigungswert an der Phasengrenzfläche

$$c^* = P_O / H$$

$P_O$ :  $O_2$ -Partialdruck in der Gasphase  
 $H$ : Henry'sche Konstante

Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung der Sauerstofflöslichkeit in einer 0,25 M Sulfitlösung bei 30° C [57], des  $O_2$ -Partialdruckes in der Gasphase und der Annahme einer Gelöstsauerstoffkonzentration von Null ( $c_l = 0$ ).

## 2.11 Harz-Abrieb im 6-L-Bioreaktor

Das Kulturgefäß des Bioreaktors wurde mit HEPES-Puffer (pH 7,3) und 2 % (v/v) XAD-16 befüllt. Der Reaktor wurde für jeweils 48 h mit einer konstanten Drehzahl und Belüftungsrate betrieben. Zur Probennahme (pro 48-h-Versuch 6 Proben) wurden dem Versuchsansatz 10 mL entnommen und über ein Metallsieb (Maschenweite 250 µm) abfiltriert. Nach geeigneter Verdünnung wurde die optische Dichte des Filtrats bei 550 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Abriebs diente eine Kalibrierungskurve. Sie wurde durch  $OD_{550}$ -Messungen (Messbereich von 0 - 0,25 AU) von XAD, welches in einem Porzellanmörser fein zerrieben wurde, erstellt. Die Ausgleichsgerade der Kalibrierungsmessungen hatte die Gleichung  $OD_{550} = 2,11 [AU \%^{-1}] \cdot \text{XAD-Konz} [\%]$  mit einem Regressionskoeffizienten von  $R = 0,997$ . Aus dem zeitlichen Verlauf des XAD-Abriebs konnte durch die Steigung der Ausgleichsgeraden eine Abriebrate ermittelt werden.

## 2.12 Einbauversuche

Der Einbau verschiedener Vorstufen in Tubulysin wurde in 100-mL-Erlenmeyerkolben mit 20 mL M7Yr-Medium (siehe 2.2.2) mit 2 % (v/v) XAD-16 untersucht. Die radioaktiv markierten Substanzen wurden der Kultur unmittelbar nach dem Animpfen zugegeben. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über die untersuchten Substanzen und deren Aktivitäten.



**Tabelle 8: Eingesetzte Aktivitäten bei Einbauversuchen**

Substanz	Markierung	eingesetzte Aktivität
L-Tyrosin	U- <sup>14</sup> C	0,37·10 <sup>6</sup> Bq (10 µCi)
L-Cystein	<sup>35</sup> S	0,37·10 <sup>6</sup> Bq (10 µCi)
L-Phenylalanin	U- <sup>14</sup> C	0,37·10 <sup>6</sup> Bq (10 µCi)

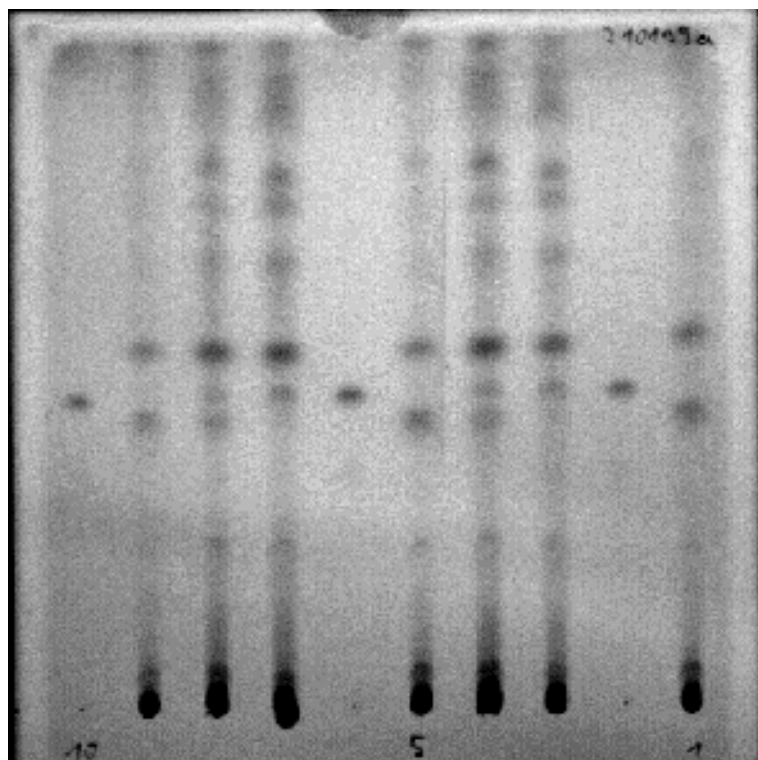
Nach einer Kultivierungszeit von 5 Tagen wurde das XAD abgesiebt und mit Methanol (5 mL) über Nacht extrahiert. Der Extrakt wurde zur Trockne eingeengt, in 200 µL Methanol aufgenommen und über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe dazu Abschnitt 2.6.2). Der aufgetrennte Extrakt wurde anschließend mit einem Dünnschichtscanner (Trace-master 20/Chroma 1d, Berthold, Wildbad) analysiert. Wenn nicht gesondert angegeben betrug die Meßdauer 20 min.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analysemethoden für Tubulysin

##### 3.1.1 DC-Analytik

Die im Material und Methodenteil aufgeführte HPTLC-Methode (vgl. Abschnitt 2.6.2) führte zu den in Abb. 4 beispielhaft dargestellten Chromatogrammen. Die  $R_f$ -Werte für die getesteten Tubulysine variierten durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen, wie Labor-temperatur oder Luftfeuchtigkeit leicht (Tabelle 9). Durch stets mitlaufende Standards konnte den Flecken aber die richtige Substanz zugeordnet werden. Außerdem hatten die Flecken der XAD-Extrakte, die auf der Höhe des Tubulysins A liefen, das gleiche UV-Spektrum wie die Tubulysin A-Standards, was in Abb. 5 gezeigt wird. Ferner konnte mit Substanz, die von der DC-Platte abgekratzt wurde, im Cytotoxizitätstest der typische Tubulysin-Effekt beobachtet werden.



von rechts nach links:

- Spur 1: Ar315 Klon 5.1
- Spur 2: Tubulysin A Standard
- Spur 3: Ar315 Klon 3.7
- Spur 4: Ar315 Klon 5.1+3.7
- Spur 5: Ar315 Klon 5.1
- Spur 6: Tubulysin A Standard
- Spur 7: Ar315 Klon 3.7
- Spur 8: Ar315 Klon 5.1+3.7
- Spur 9: Ar315 Klon 5.1
- Spur 10: Tubulysin A Standard

**Abb. 4:** Dünnschichtplatte (HPTLC 100 mm×100 mm) nach Auftrennung von XAD-Extrakten, bzw. Tubulysin-A-Standards

**Tabelle 9: R<sub>F</sub>-Werte von Tubulysinen (HPTLC-Bedingungen vgl. 2.6.1)**

Tubulysin-Variante	R <sub>F</sub> -Wert
<b>Tubulysin B</b>	<b>0,22-0,30</b>
<b>Tubulysin A</b>	<b>0,27-0,35</b>
<b>Tubulysin D</b>	<b>0,33-0,38</b>

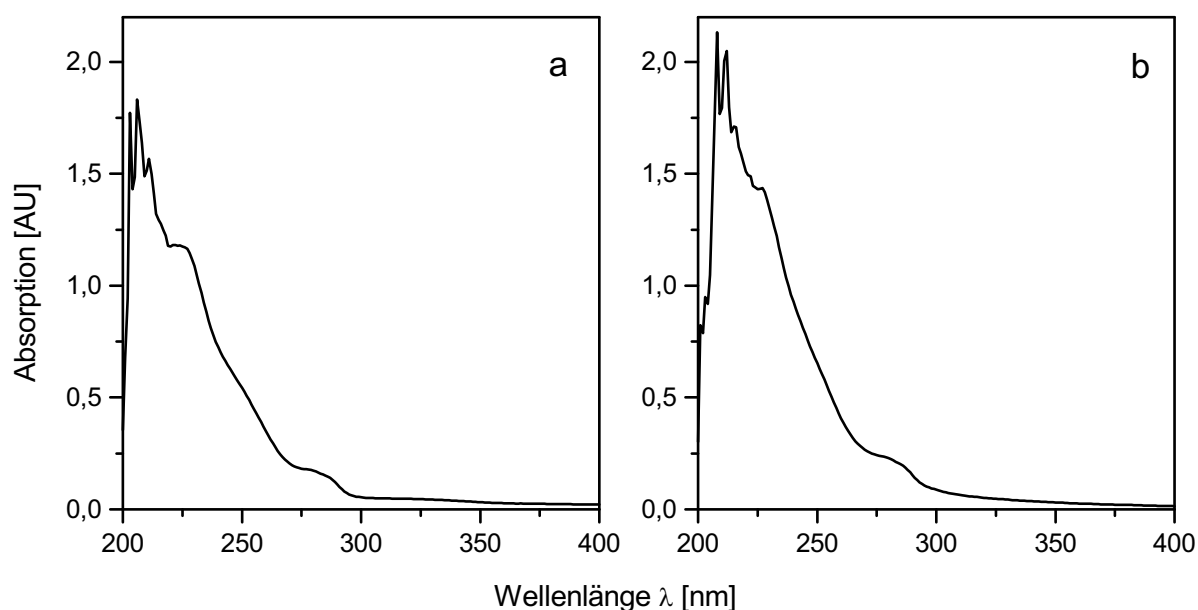
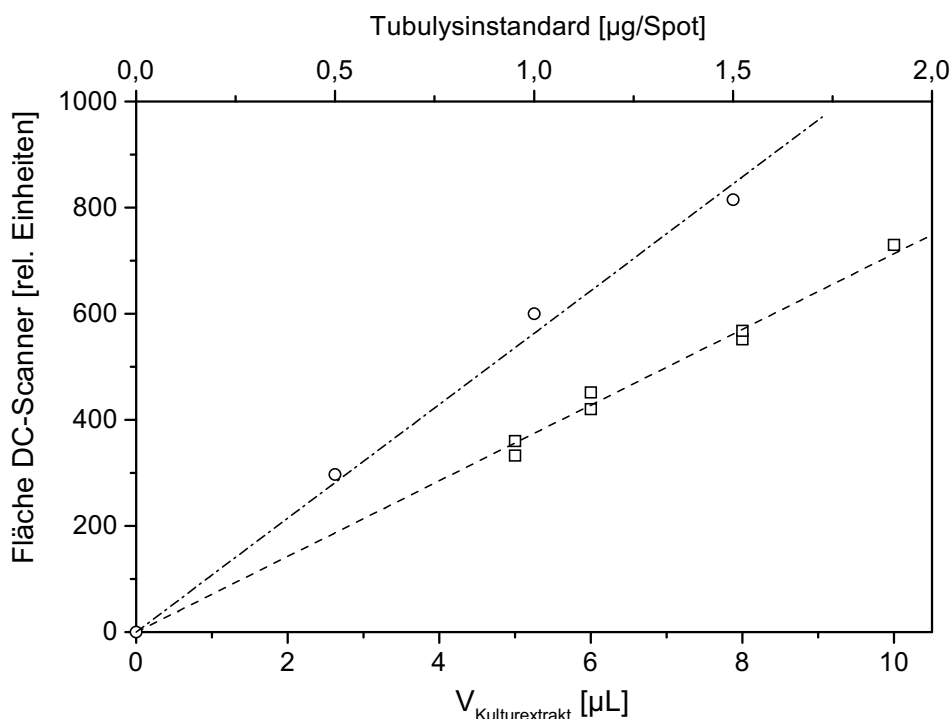
**Abb. 5: UV-Spektren von Flecken (R<sub>F</sub>: 0,27) auf einer HPTLC-Platte nach Lauf eines Tubulysin A-Standards (a) bzw. eines XAD-Extraktes von *Archangium gephyra* (b)**

Abb. 6 zeigt die Qualität der DC-Analytik. Im Falle der Standards hat die dargestellte Ausgleichsgerade einen Regressionskoeffizienten von  $R = 0,9972$ . Die Ausgleichsgerade des beispielhaft in verschiedenen Konzentrationen und mehrfach aufgetragenen Kulturextraktes hat einen Regressionskoeffizienten von  $R = 0,9926$ .



**Abb. 6: Qualität der DC-Analytik: Verhältnis von aufgetüpfelter Tubulysinstandardmenge pro Fleck zu der vom DC-Scanner ermittelten Fläche (○) und Verhältnis von aufgetüpfeltem Volumen eines Kulturextraktes zu der vom DC-Scanner ermittelten Fläche (□)**

### 3.1.2 HPLC-Analytik

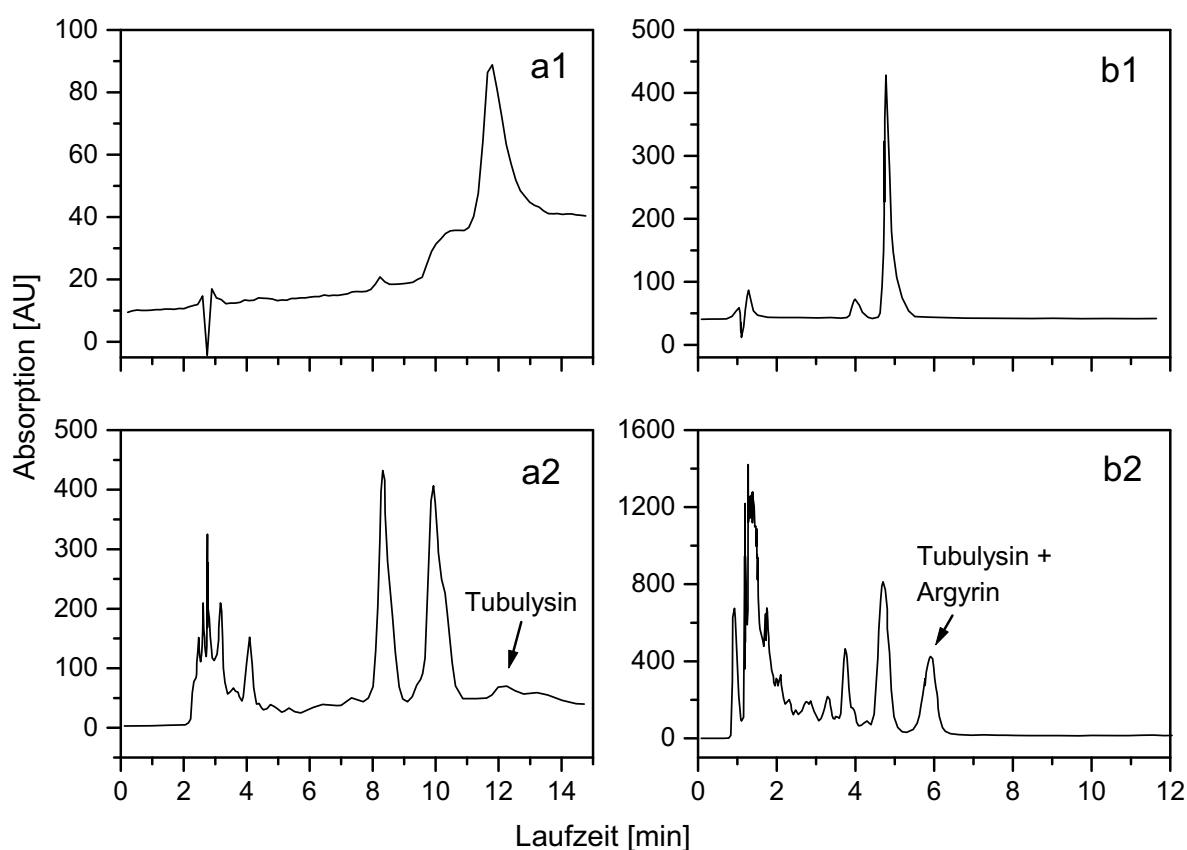
Die im Material und Methodenteil beschriebenen unterschiedlichen Bedingungen der HPLC führten zu unterschiedlichen Chromatogrammen (vgl. Abschnitt 2.6.1). Auffällig war eine ungenügende Trennung des Tubulysins von Nebenprodukten (Argyrine) bei Verwendung von Umkehrphase-Säulen. Die Trennung konnte durch die Verwendung von Normalphase-Säulen erreicht werden. Allerdings konnten auf diese Weise keine diskreten Peaks erzeugt werden, so daß die gewählten Bedingungen analytischen Ansprüchen nicht genügten. Die folgende Tabelle (Tabelle 10) gibt eine Übersicht über die Trennung und über die Peakschärfe in den unterschiedlichen Läufen.

**Tabelle 10: Trennung und Peakschärfe bei HPLC-Läufen zur Tubulysinbestimmung. Zu den Bedingungen der einzelnen Läufe siehe Abschnitt 2.6.1**

Lauf	Säule	Trennung	Peakschärfe	Lauf	Säule	Trennung	Peakschärfe
1	RP1	--	-	10	NP	+	--
2	RP1	--	--	11	NP		--
3	RP1	--	+/-	12	NP	-	--

4	RP1	--	+	13	RP1	--
5	RP1	--	+	14	RP1	-
6	RP2	--	+	15	RP1	-
7	RP1	--	++	16	RP1	-
8	RP1	--	++	17	RP1	-
9	RP1	--	+			

In Abb. 7 sind beispielhaft die Chromatogramme von zwei HPLC-Läufen dargestellt. Die UV-Spektren der mit den Pfeilen markierten Peaks zeigten für den Lauf mit der Normalphase-Säule (Lauf 10) das typische Tubulysinpektrum, für die Umkehrphase-Säule (Lauf 8) zeigte der Peak ein gemischtes Spektrum, was auf eine ungenügende Trennung hinweist.

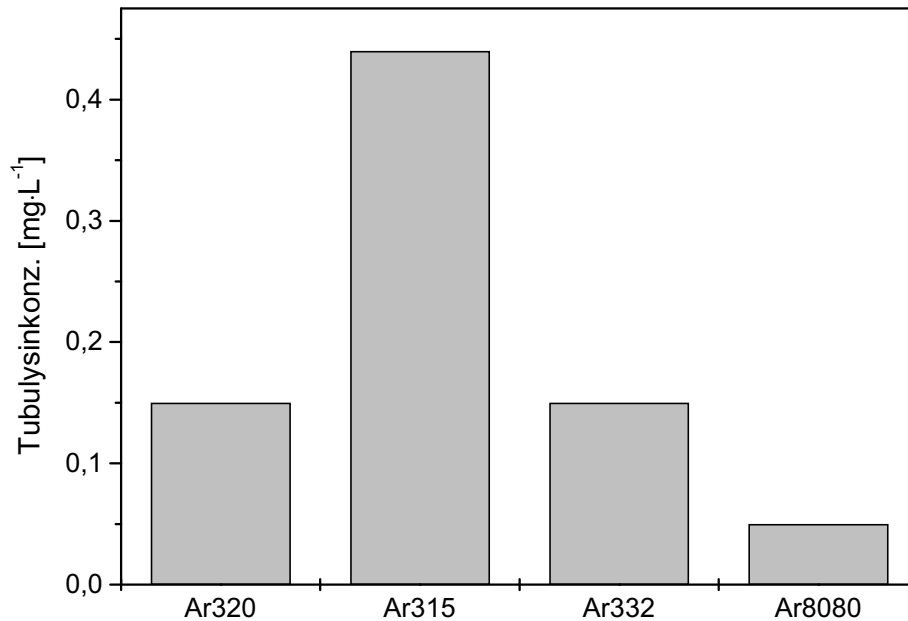


**Abb. 7: HPLC-Chromatogramme von Tubulysinstandards (a1, b1) und von Kulturextrakten (a2, b2) der Läufe 8 (b1, b2) und 10 (a1, a2); Erläuterungen siehe Fließtext**

### 3.2 Tubulysinproduktion verschiedener Stämme von *Archangium gephyra*

Die Produktion von Tubulysin A konnte bei vier verschiedenen Stämmen von *Archangium gephyra* der Stammsammlung der Abteilung Naturstoffbiologie der GBF beobachtet werden. Diese unterschiedlichen Ausgangsstämme zeigten in M7+-Medium unterschiedlich hohe

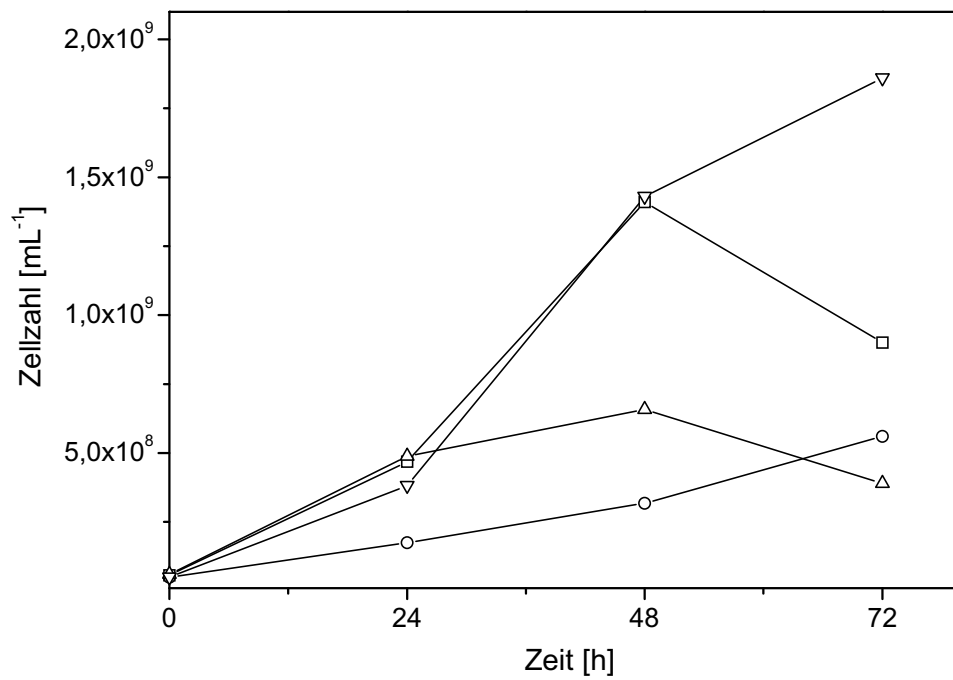
Tubulysinproduktionen. Abb. 8 zeigt die Tubulysinkonzentrationen der Stämme Ar315, Ar320, Ar332 und Ar8080 im Überstand der Kulturbrühe nach 6tägiger Fermentation im Schüttelkolben. Alle Stämme zeigten ein nichthomogenes, klumpiges Wachstum.



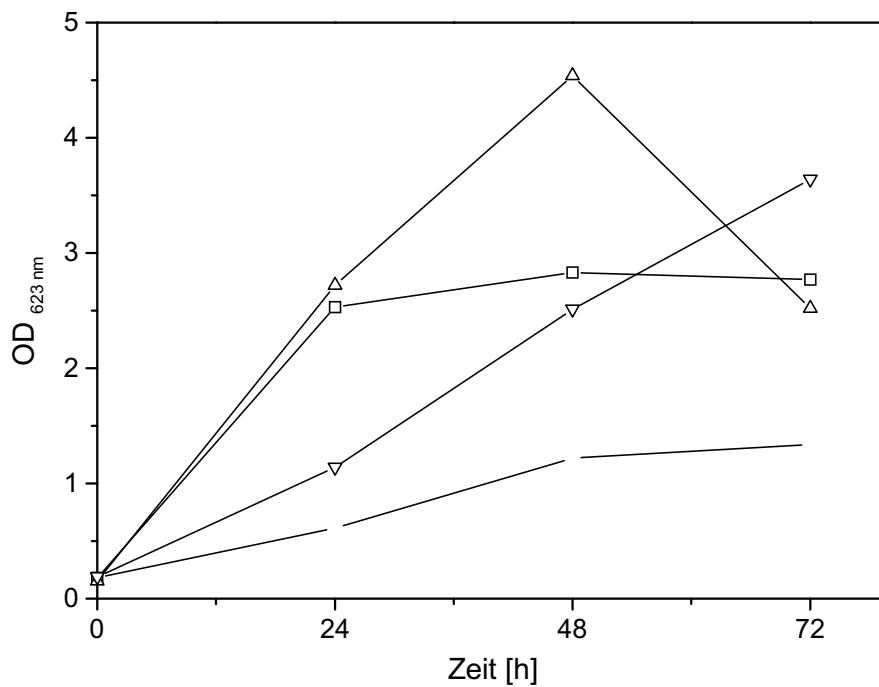
**Abb. 8:** Tubulysinkonzentration in Kulturbrühen verschiedener Stämme von *Archangium gephyra*

### 3.3 Einfluß verschiedener komplexer Stickstoffquellen auf das Wachstum von Ar315

Um ein möglichst homogenes Wachstum der Kultur zu erzielen, erfolgte eine Kultivierung in klaren Medien auf der Basis von M7+. Nach einigen Impfzyklen stellte sich bei allen hier getesteten Medien (M7Y, M7C, M7P, M7T) ein homogenes Wachstum ein. Eine mikroskopische Betrachtung der Kulturen zeigte deutlich voneinander getrennte Einzelzellen. Die verschiedenen Stickstoffquellen unterschieden sich in ihrem Phosphatgehalt. 1%ige Lösungen hatten folgende Konzentrationen an Phosphat: Hefeextrakt 1,9 mM, Casitone 1,2 mM, Peptone 0,14 mM, Tryptone 1,2 mM. Als Parameter für das Wachstumsverhalten von Ar315 in den unterschiedlichen Medien wurden die Zellzahl (Abb. 9) und die optische Dichte der Kultur (Abb. 10) bestimmt. Sowohl die höchste Zellzahl, als auch die höchste optische Dichte nach 72 h Fermentation wurde im Hefeextrakt-Medium erzielt.



**Abb. 9: Zellzahl im Verlauf der Kultivierung von Ar315 mit verschiedenen Stickstoffquellen (M7C, □; M7P, ○; M7T, △; M7Y, ▽)**



**Abb. 10: Optische Dichte im Verlauf der Kultivierung von Ar315 mit verschiedenen Stickstoffquellen (M7C, □; M7P, ○; M7T, △; M7Y, ▽)**

### 3.4 Wachstums- und Produktionsverhalten von Ar315 im Schüttelkolben

Abb. 11 zeigt Wachstumskurven von Ar315 in M7Y-Nährboullion. Nach einer lag-Phase von 15 h stieg sowohl die optische Dichte, als auch die Bakterienzellzahl exponentiell an. Nach 48 h kam das Wachstum für 8 h zum Erliegen, um dann erneut sprunghaft anzusteigen. Nach einer sehr kurzen stationären Phase von 18 h nahm sowohl die Bakterienzellzahl als auch die optische Dichte rasch ab. Außerdem ist in Abb. 11 die Tubulysinkonzentration in XAD-Eluaten zu verschiedenen Zeiten der Fermentation dargestellt. Ein erster starker Anstieg der Tubulysinkonzentration ist nach 72 h in der stationären Phase zu erkennen. Die Tubulysinendkonzentration beträgt nach 168 h in M7Y-Medium  $0,24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

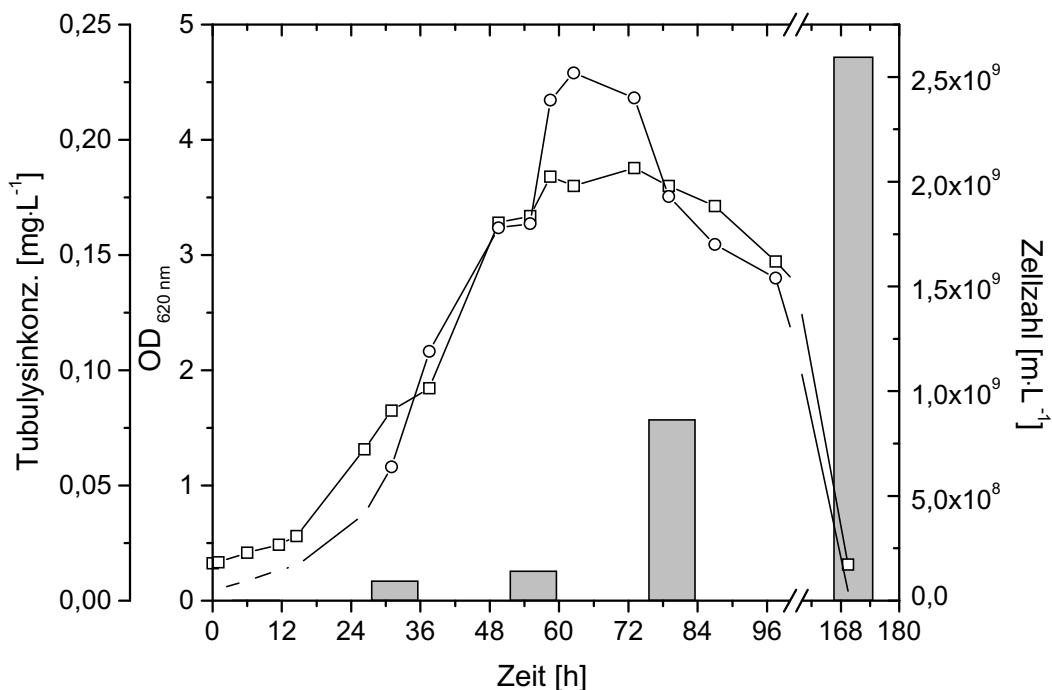


Abb. 11: Zellzahl (○), optische Dichte (□) und Tubulysinkonzentration (■) im Verlauf der Schüttelkolbenfermentation von Ar315 in M7Y

### 3.5 Auswirkung von XAD-16 auf die Produktion von Tubulysin

Abb. 12 zeigt die Tubulysinkonzentrationen im Kulturüberstand bzw. im Zellextrakt nach Kultivierung von Ar315 in M7+ im Schüttelkolben. Dargestellt sind die Werte für Kultivierung mit bzw. ohne Adsorberharzes XAD-16 (2 %, v/v) im Medium. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf einen Liter Kultur. In der Kultur mit XAD konnte Tubulysin A im Kulturüberstand nur in Spuren nachgewiesen werden. Im XAD-Eluat ist nach der Fermentation mit XAD allerdings eine 13fach höhere Tubulysinkonzentration zu finden



als im Kulturüberstand nach Kultivierung ohne das Adsorberharz. In den Zellextrakten der verschiedenen Ansätze findet sich die gleiche Tubulysinkonzentration. In der Summe liegt die Tubulysinkonzentration mit XAD im Medium bei  $3,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Summe aus Zellextrakt, Kulturüberstand und XAD-Eluat) und ist damit 4,6 fach höher als die Summe der Tubulysinkonzentrationen im Ansatz ohne XAD-16 (Summe aus Zellextrakt und Kulturüberstand).

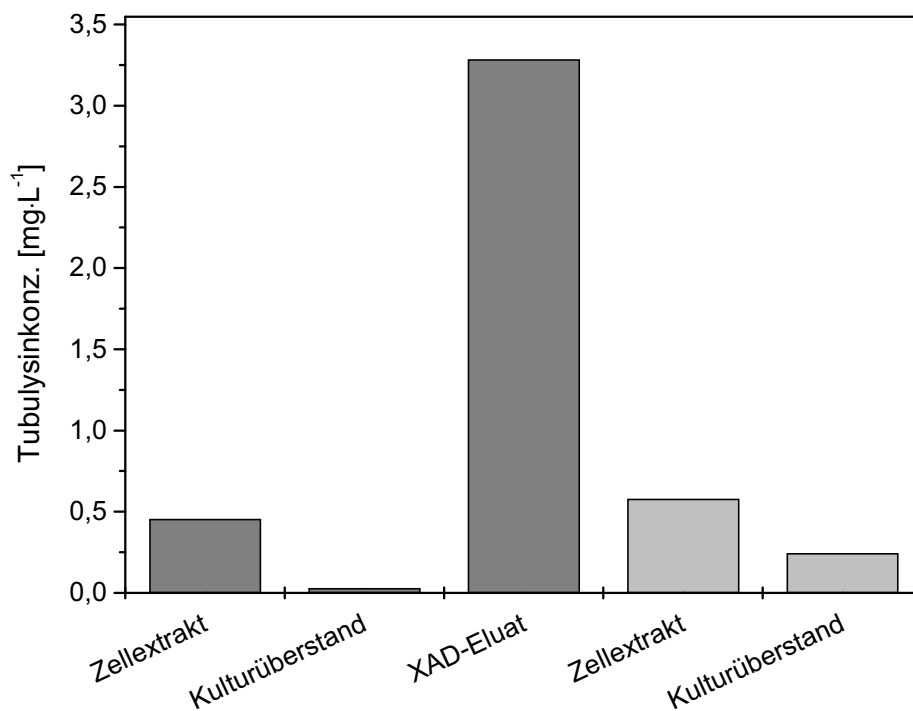
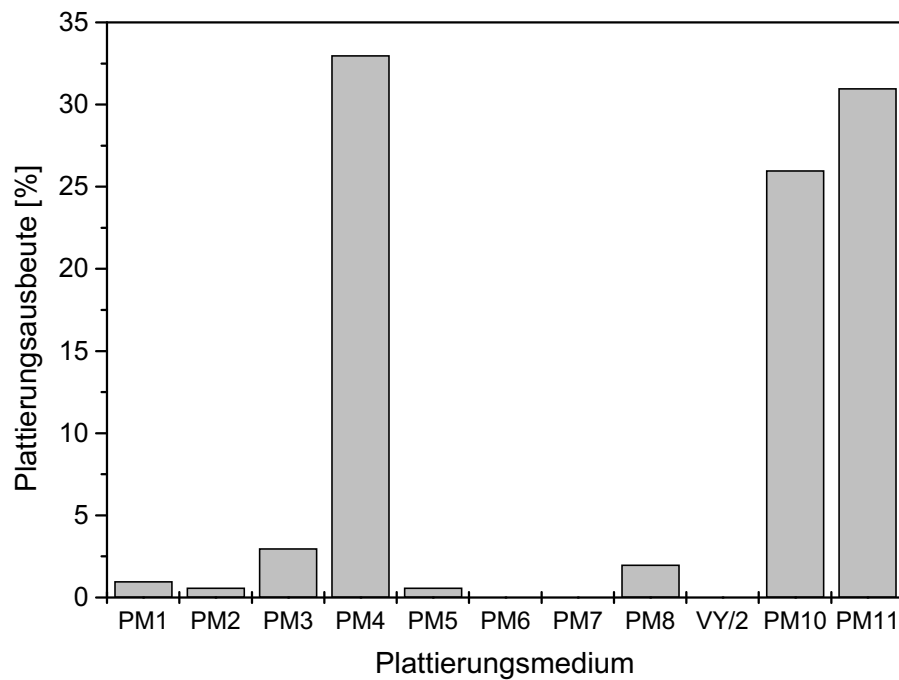


Abb. 12: Produktion von Tubulysin A durch *Archangium gephyra* Ar315 mit (■) bzw. ohne (□) XAD-16 im Medium (Erläuterungen siehe Fließtext)

### 3.6 Plattierungsausbeuten auf unterschiedlichen Medien

Der in Abschnitt 2.2.1 beschriebene VY/2-Agar (hier auch als PM9 geführt) eignete sich nicht zur Erzeugung von Kolonien aus einzelnen Zellen. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich 10 verschiedene Medien (vgl. Abschnitt 2.2.3) mit verschiedenen Stickstoffquellen hinsichtlich ihrer Plattierungsausbeute getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 zusammengefaßt.

Bei keinem der getesteten Medien wurde eine Plattierungsausbeute von 100 % erreicht. Am besten eigneten sich die Medien PM4 und PM11. Von 100 ausplattierten Zellen einer homogenen Kultur von *Archangium gephyra* Ar315 wuchsen nach 5 Tagen Kultivierung mehr als 30 makroskopisch sichtbare Kolonien auf. Nach insgesamt 14 tägiger Kultivierung erhöhte sich die Zahl der aufgewachsenen Kolonien auf 35 %.



**Abb. 13: Plattierungsausbeuten von Ar315 nach 5 Tagen auf verschiedenen Medien**

### **3.7 Merkmale innerhalb einer Kolonipopulation von *Archangium gephyra***

#### **3.7.1 Produktionsverteilung von Tubulysin A innerhalb einer Kolonipopulation**

Die einzelnen Klone von *Archangium gephyra* Ar315, die durch die Plattierung auf PM4 erzeugt wurden, zeigten ein unterschiedliches Produktionsverhalten. Eine erste Auffälligkeit waren die unterschiedlichen Tubulysin A-Konzentrationen bei den verschiedenen Klonen. Abb. 14 zeigt die Tubulysin A-Produktionsverteilung innerhalb einer Kolonipopulation. Die in Abb. 14 dargestellten relativen Tubulysinkonzentrationen wurden durch Cytotoxizitätstests von Agar-Kulturextrakten ermittelt. Nach Kultivierung der guten Produzenten in M7+-Medium im Schüttelkolben erfolgte eine Überprüfung der Produktionsleistung durch Dünnschichtchromatographie von XAD-Extrakten. Die Tubulysinkonzentrationen dieser Versuche sind in Abb. 15 dargestellt.

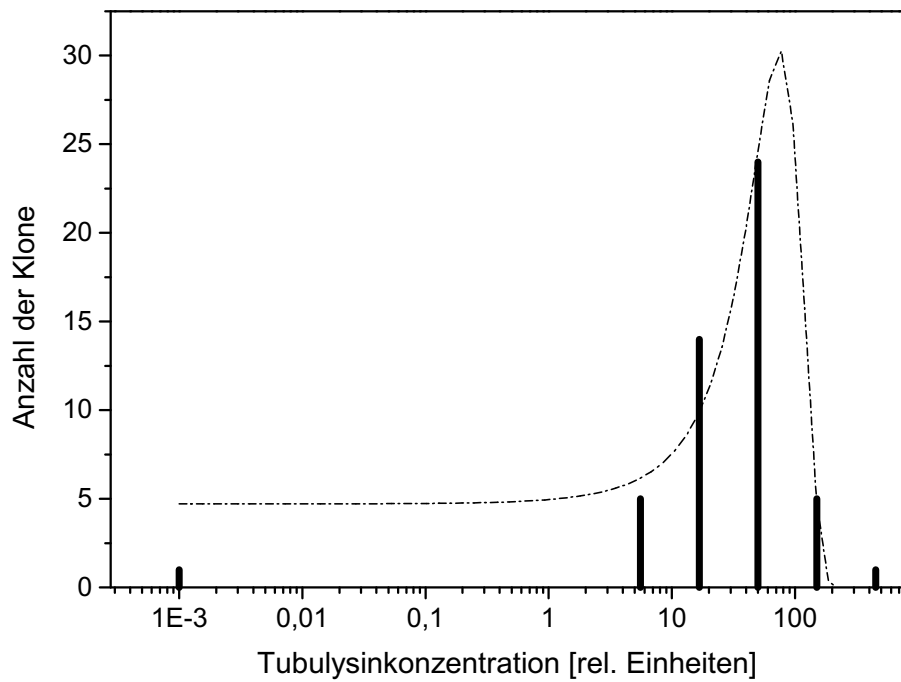


Abb. 14: Leistungsverteilung in einer Kolonipopulation von Ar315 (■) und Normalverteilung (---)

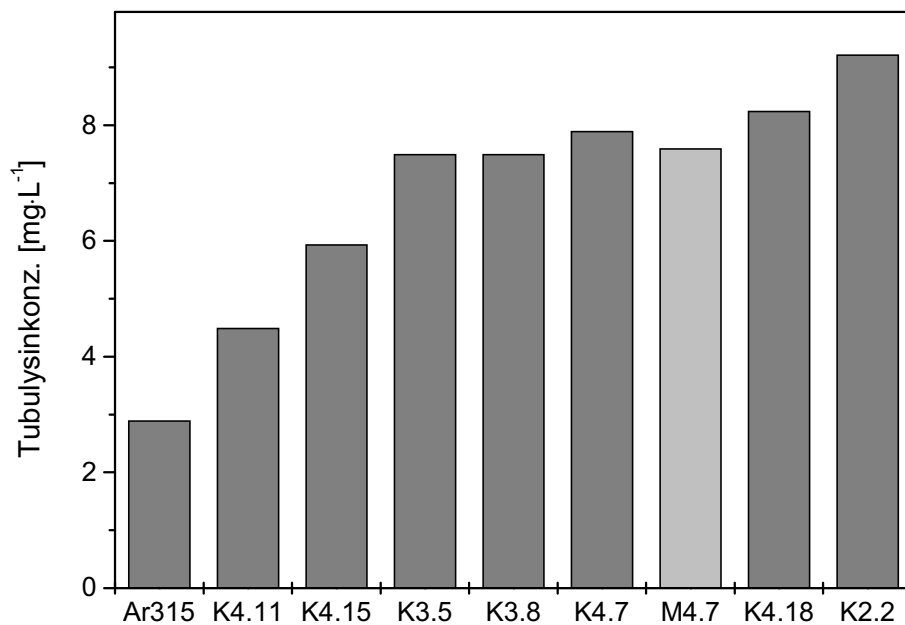
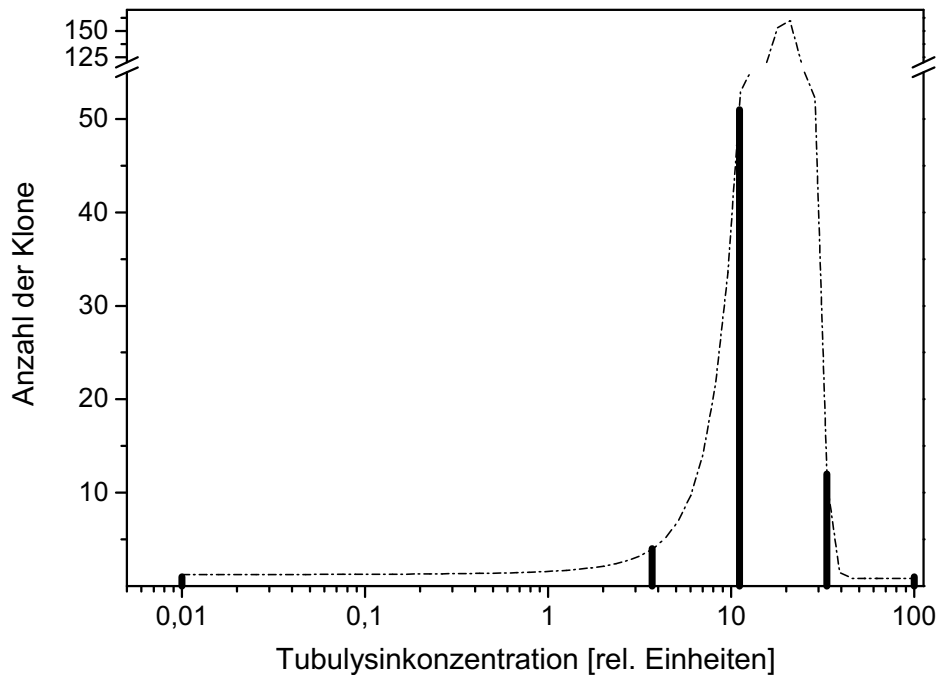


Abb. 15: Tubulysinkonzentrationen nach Kultivierung verschiedener Einzelklone (■) des Ausgangsstammes Ar315 von *Archangium gephyra* und bester Klon nach UV-Bestrahlung von K4.7 (M4.7, □)

### 3.7.2 Produktionsverteilung von Tubulysin A nach Mutagenisierung an Ar315 K4.7

Nach der Erzeugung von Einzelklonen wurde versucht, die Tubulysinproduktion durch Mutagenisierung zu erhöhen. Abb. 16 zeigt die Anzahl der Klone mit unterschiedlichen Tubulysinkonzentrationen nach UV-Bestrahlung. Die in Abb. 16 dargestellten Daten wurden in einem Cytotoxizitätstest ermittelt. Die Überprüfung der besten Klone in Schüttelkolben zeigte keine Verbesserung zum Ausgangsklon.



**Abb. 16: Produktionsverteilung in einer Kolonipopulation von Ar315 K4.7 nach UV-Bestrahlung (■) und Normalverteilung (---)**

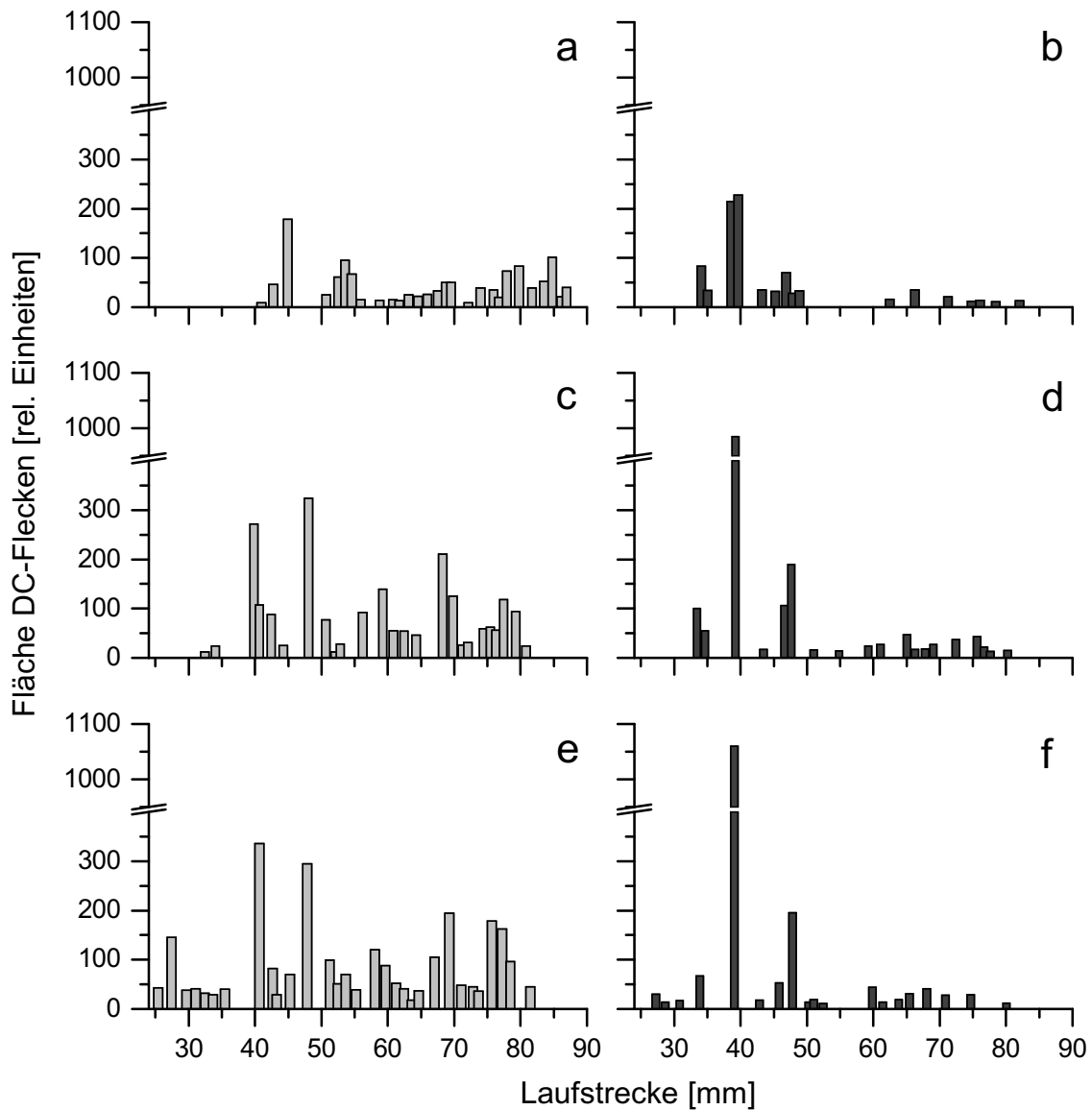
### 3.7.3 Substanzspektrum

Während sich viele erzeugte Einzelklone durch unterschiedliche Tubulysinproduktion auszeichneten, zeigten fast alle Klone das gleiche Substanzspektrum auf der Dünnschichtplatte. Beispielhaft für dieses Substanzspektrum ist die Auftrennung des XAD-Extraktes von Ar315 Klon 3.7 in Abschnitt 3.1.1. Ein Klon (K5.1) zeigte im Gegensatz zu allen anderen erzeugten Klonen ein verschobenes Substanzspektrum (siehe dazu ebenfalls Abb. 4 in Abschnitt 3.1.1). Während auf der Höhe des Tubulysin A kein Fleck auf der Dünnschichtplatte zu erkennen ist, liegt ein Fleck unterhalb des Tubulysin A, welcher als Tubulysin B identifiziert werden konnte.

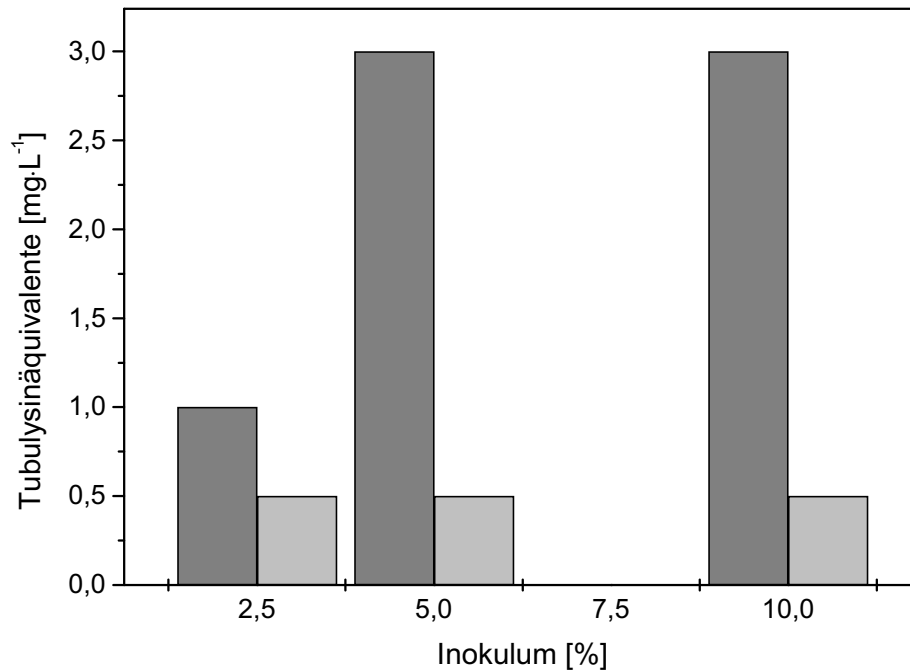
### 3.8 In Alginat eingehüllte Zellen im Vergleich zu freien Zellen

Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, führte die Kultivierung von in Alginat eingehüllten Zellen des Stammes Ar315 K3.7 im Vergleich zu nativen Zellen zu einem veränderten Substanzspektrum. Während sich die Chromatogramme a und b noch ähneln, zeigen sich im Ansatz mit 5 % Inokulum (Abb. 17, c+d) bereits deutlich Unterschiede. Beim  $R_f$ -Wert des Tubulysin A (hier 0,43; Laufstrecke 39 mm) war im Ansatz mit nativen Zellen ein Fleck mit einer Fläche von 260 Einheiten zu erkennen. Bei diesem  $R_f$  war im Ansatz mit Alginat-eingehüllten Zellen ein Fleck mit einer Fläche von 980 Einheiten zu sehen. Dieser Unterschied war in den Ansätzen mit 10 % Inokulum (Abb. 17, e+f) noch verstärkt. Dünnschichtchromatogramme von Kontrollen, die mit Alginatkugeln ohne Zellen gewonnen wurden, zeigten lediglich einen leichten Fleck am Start des Chromatogramms. Die im Alginatansatz verstärkt registrierte Substanz muß also von den Zellen produziert worden sein. Eine Untersuchung der XAD-Extrakte im Zelltest zeigte aber, daß es sich bei dieser Substanz nicht um Tubulysin A handelte. Die tubulysintypische Aktivität im Cytotoxizitätstest war in den nativen Ansätzen deutlich höher, wie Abb. 18 zeigt.

Weitere Unterschiede im Substanzspektrum lassen sich im höheren  $R_f$ -Bereich des Chromatogramms erkennen. In den nativen Ansätzen sind deutliche Fecken im Bereich von  $R_f$  0,63 (Laufstrecke 57 mm),  $R_f$  0,75 (Laufstrecke 68 mm) und  $R_f$  0,83 (Laufstrecke 75 mm) zu erkennen, die im Ansatz mit Alginatkugeln nur sehr schwach ausgeprägt sind.



**Abb. 17:** Fleckenflächen nach HPTLC von XAD-Extrakten aus Kulturen mit nativen und immobilisierten Zellen von Ar315; Inokulum: a) native Zellen, 2,5 %; b) immob. Zellen, 2,5 %; c) native Zellen, 5 %; d) immob. Zellen, 5 %; e) native Zellen, 10 %; f) immob. Zellen, 10 %.



**Abb. 18:** Cytotoxizitätstest von XAD-Extrakten von Kulturen mit nativen (■) und mit alginateingehüllten Zellen (□) von Ar315 K3.7.

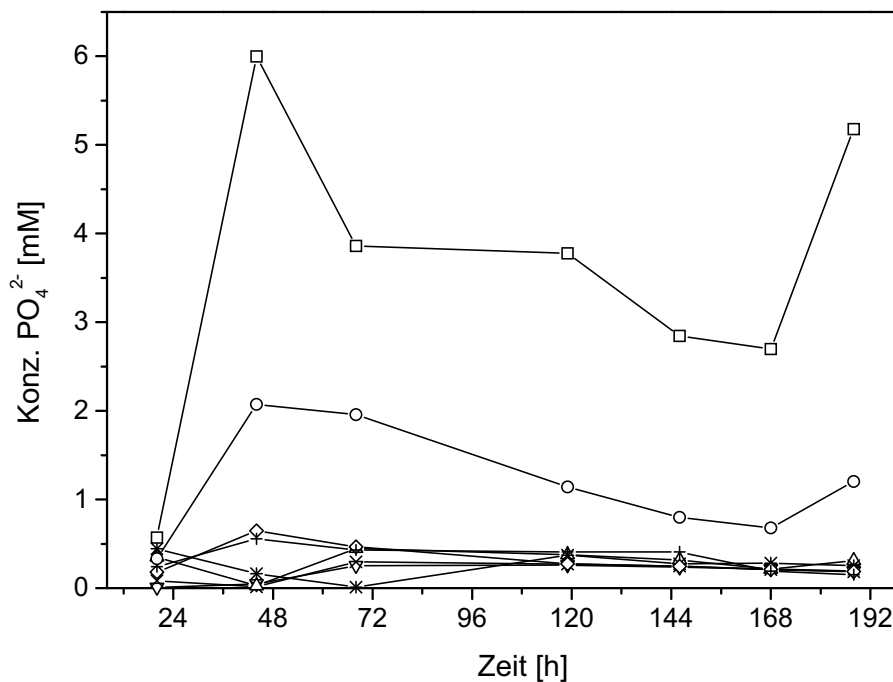
### 3.9 Einfluß von Medienvariationen auf die Tubulysinproduktion

Die Zusammensetzung des Produktionsmediums hat häufig einen großen Einfluß auf die Sekundärstoffproduktion. Im folgenden sind die Ergebnisse aufgeführt, die durch Variation der Phosphatkonzentration, des pH-Wertes und der Spurenelementzugabe erzielt wurden. Außerdem wurden eine Reihe von Parametern mit der Methode des Griechisch-Lateinischen Quadrats untersucht.

#### 3.9.1 Phosphat

In Abb. 19 ist der Verlauf der Phosphatkonzentration während der Kultivierung dargestellt. Bei den Ansätzen mit 5 und 10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$  Ausgangskonzentration erkennt man im Kulturüberstand nach 20 h einen deutlich geringeren Wert als nach 44 h. In diesen beiden Ansätzen konnte nach Zugabe des Salzes ein sich bildender Niederschlag beobachtet werden, der erklärt, warum zu Beginn der Kultivierung die eingesetzte Phosphatkonzentration nicht im Überstand nachgewiesen werden konnte. Erst nach 44 h war ein Großteil der eingesetzten Konzentration auch im Überstand nachzuweisen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung erkennt man in den hochmolaren Ansätzen bis zum Zeitpunkt  $t = 168$  h eine deutliche Abnahme der Phosphatkonzentration. Nach 168 h steigt der Phosphatgehalt in diesen

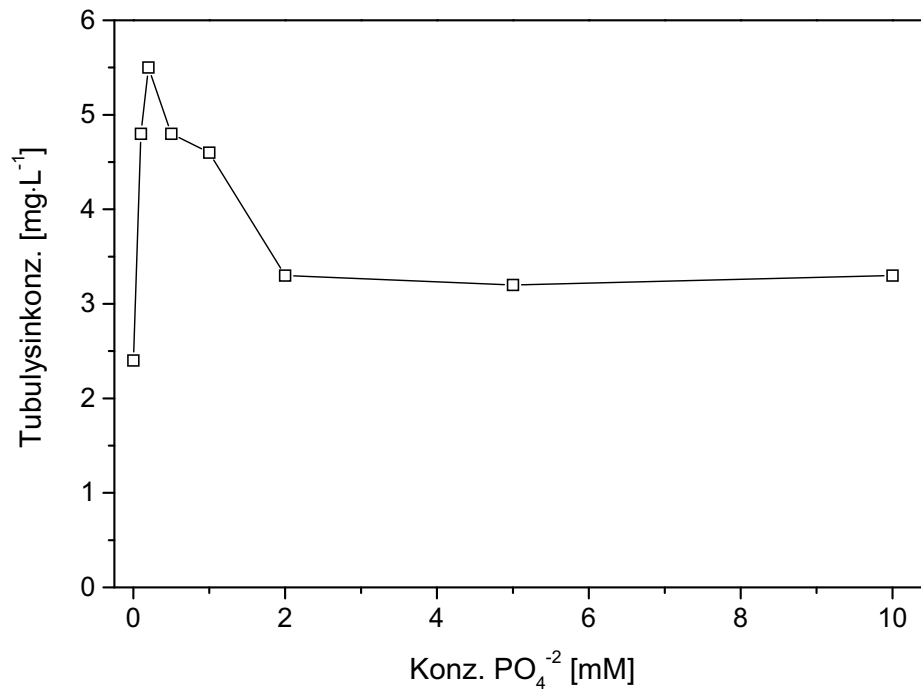
Ansätzen wieder an. Zusammen mit dem Ansteigen der Phosphatkonzentration nach 168 h konnte ein starkes Lysieren der Zellen beobachten werden. In den Ansätzen mit geringerer Phosphatausgangskonzentration sind die Verläufe nicht so deutlich zu erkennen. Ab 120 h liegt die  $\text{PO}_4^{3-}$ -Konzentration bei den Ansätzen mit  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  oder weniger auf einem gemeinsam niedrigem Niveau von etwa  $0,2 \text{ mM}$ .



**Abb. 19: Phosphatkonzentration im Verlauf der Kultivierung von Ar315 in M7P-Medium mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0 mM (▽), 0,1 mM (×), 0,2 mM (Δ), 0,5 mM (\*), 1 mM (◇), 2 mM (+), 5 mM (○), 10 mM (□)**

Gerade in den niedrigen Konzentrationsbereichen zeigen sich deutliche Unterschiede in den Endtubulysinkonzentrationen. Abb. 20 zeigt den Einfluß der Ausgangsphosphatkonzentration auf den Tubulysingehalt am Ende der Kultivierung. Unter den gewählten Bedingungen ist die Tubulysinausbeute bei einem Anfangsphosphatgehalt von  $0,2 \text{ mM}$  mit  $5,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  am höchsten. Auffällig ist ebenfalls, daß die Tubulysinkonzentration im Bereich von  $2 \text{ mM}$  bis  $10 \text{ mM}$  konstant bleibt. Aufgrund des klumpigen Wachstums des eingesetzten Klon konnte der Einfluß von Phosphat auf das Wachstum nicht untersucht werden.

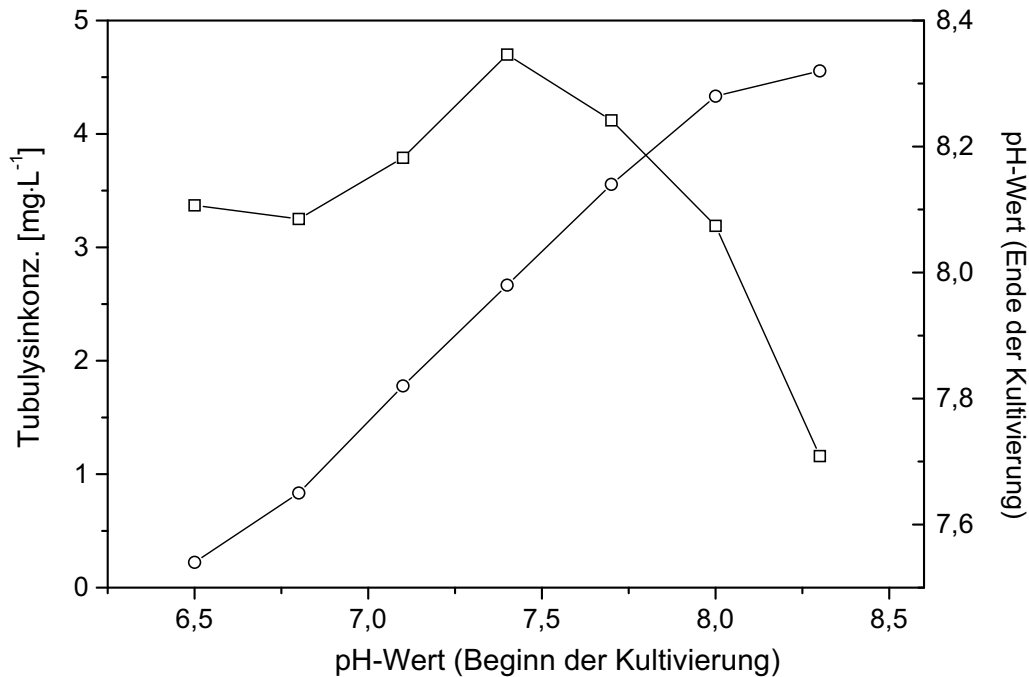




**Abb. 20: Einfluß der eingesetzten Konzentration an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf die Tubulysinproduktion**

### 3.9.2 pH-Wert

Der in den Schüttelkolben eingestellte Anfangs-pH-Wert blieb während der Kultivierung in M7+ trotz Pufferung mit  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  HEPES nicht konstant. In allen Ansätzen gab es eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich. Die End-pH-Werte (nach 120 h) der einzelnen Ansätze sind in Abb. 21 dargestellt. Außerdem zeigt Abb. 21, daß die Tubulysinkonzentration unter diesen Bedingungen bei einem Anfangs-pH-Wert von 7,4 mit  $4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  am höchsten ist.

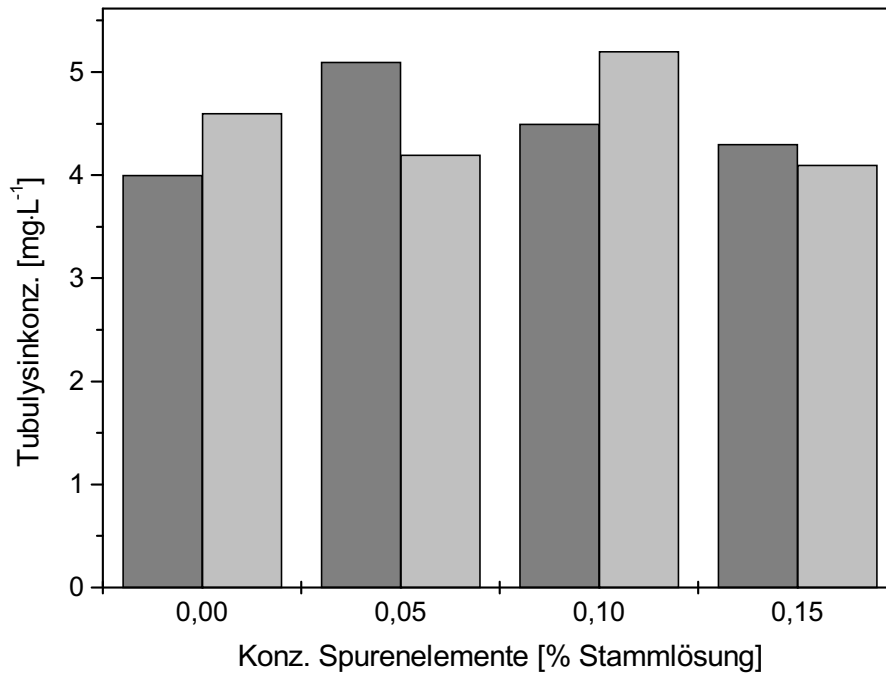


**Abb. 21: Einfluß des pH-Wertes auf die Tubulysinproduktion in Schüttelkolben (□) und pH-Wert zum Ende der Kultivierung bei unterschiedlichen Anfangs-pH-Werten (○)**

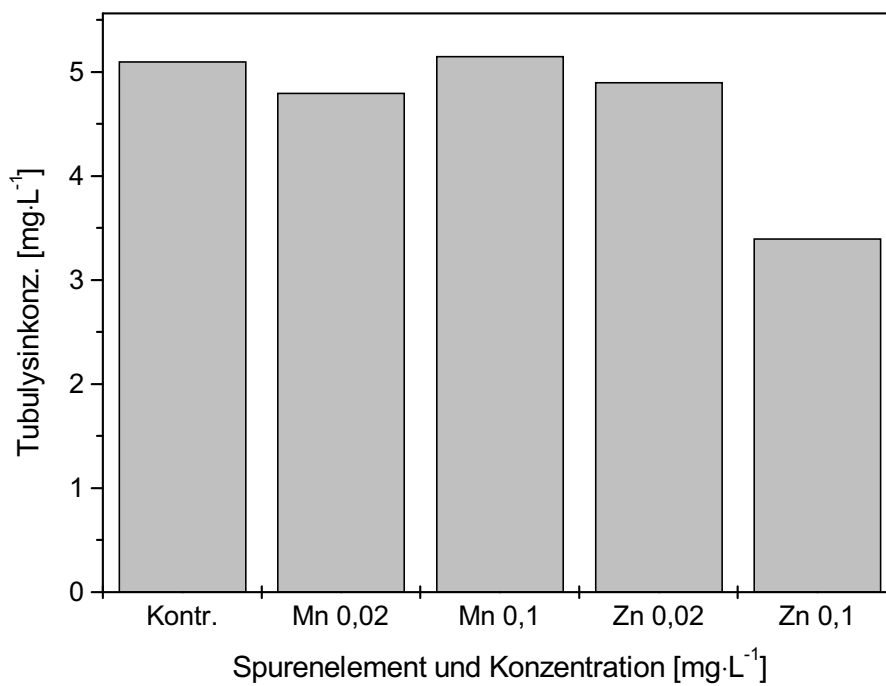
### 3.9.3 Spurenelemente

Die folgenden zwei Abbildungen (Abb. 22, Abb. 23) zeigen die Tubulysinproduktion in Ar315-Kulturen nach Zugabe von Spurenelementen. Der Einfluß des Spurenelementcocktails (Zusammensetzung vgl. 2.8.3) auf die Tubulysinkonzentration war nicht stark (Abb. 22). Tendenziell ließ sich im Medium M7+ ein schwach ausgeprägtes Optimum bei einer Spurenelementkonzentration von 0,1 % festhalten. Im Hefeextraktmedium (M7Y) war die Tubulysinkonzentration bei einer Spurenelementkonzentration von 0,05 % am höchsten.

Ebenfalls schwach ausgeprägt war der Einfluß der einzelnen Elemente Mangan und Zink (Abb. 23). Eine Erhöhung der Tubulysinkonzentration durch die Zugabe von  $\text{MnCl}_2$  bzw.  $\text{ZnCl}_2$  konnte in den getesteten Konzentrationen nicht erzielt werden. Durch die Zugabe von  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$  sank die Tubulysinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle von  $5,1$  auf  $3,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .



**Abb. 22: Einfluß der Konzentration des Spurenelementcocktails (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.8.3) auf die Tubulysinproduktion in den Medien M7Y (■) und M7+ (□)**



**Abb. 23: Einfluß einzelner Spurenelemente auf die Tubulysinproduktion**

### 3.9.4 Griechisch-Lateinisches Quadrat

Die Ergebnisse der Medienoptimierungsversuche nach der Methode des Griechisch-Lateinischen Quadrats sind in Abb. 24 und Abb. 25 zusammengefaßt. Eine Übersicht der Tubulysinkonzentrationen in den einzelnen Medien, deren Zusammensetzung im Material und Methodenteil unter 2.8.1 aufgeführt ist, findet sich in Tabelle 11.

**Tabelle 11: Tubulysinkonzentrationen der einzelnen Medien im Griechisch-Lateinischen Quadrat (Angaben in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )**

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
GLQ I	9,0	7,5	4,8	1,3	1,8	3,8	5,1	5,4	7,0
GLQ II	6,0	6,2	8,6	5,8	10,3	6,9	8,1	9,3	3,5

Auffällig im GLQ I ist, daß der Einfluß der technischen Stickstoffquellen (Probion, Bäckerhefe, Soja-Mehl) auf die Tubulysinproduktion wesentlich höher war als der Einfluß der getesteten C-Quellen. Während die C-Quellen alle eine Güte von 15 aufwiesen, zeigte die Güte der technischen Stickstoffquellen Unterschiede zwischen 6 und 21, wobei sich Probion als der meist geeignete Bestandteil herausstellte. In der Gruppe der zusätzlichen Stickstoffquellen konnte die beste Güte erzielt werden, wenn den Medien Hefeextrakt zugesetzt wurde. Bei den Salzkonzentrationen schwankte die Mediengüte zwischen 11,5 und 17,8. Die höchste Güte wurde hier mit einer Konzentration von 0,05 % des Salzgemisches  $\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CaCl}_2\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  erzielt.

Im GLQ II erkennt man einen günstigen Effekt durch die Zugabe von L-Tyrosin und L-Cystein. Der Effekt der Precursoren soll im folgenden näher untersucht werden. Weiterhin erzielte im GLQ II die Maltose unter den getesteten C-Quellen die beste Güte.

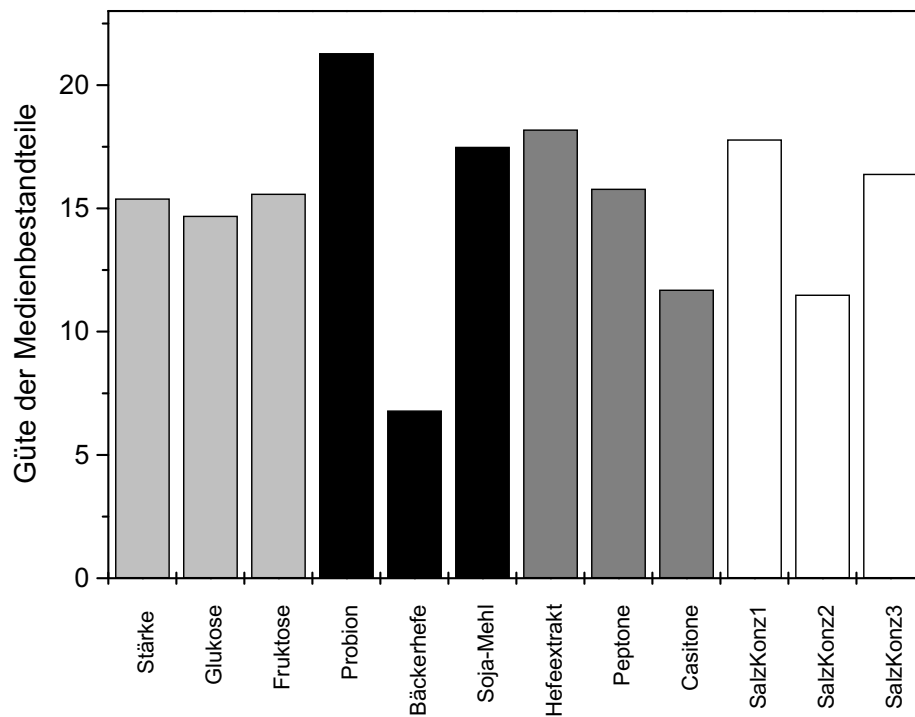


Abb. 24: Güte der Medienbestandteile im Griechisch-Lateinischen Quadrat I (C-Quellen, ; techn. Stickstoffquellen, ; zusätzliche Stickstoffquellen, ; Salzkonzentration, )

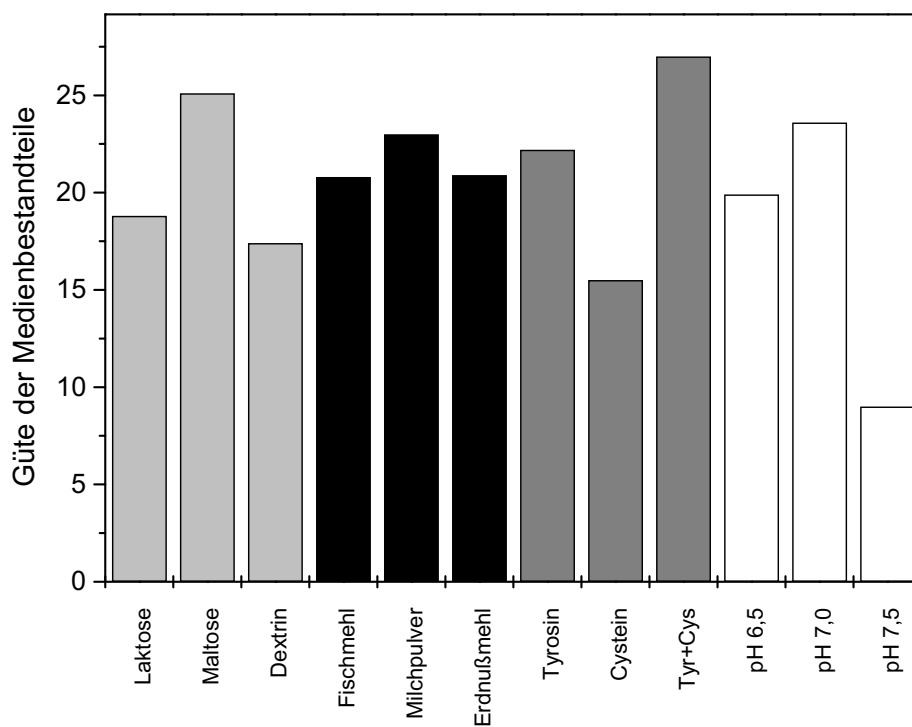






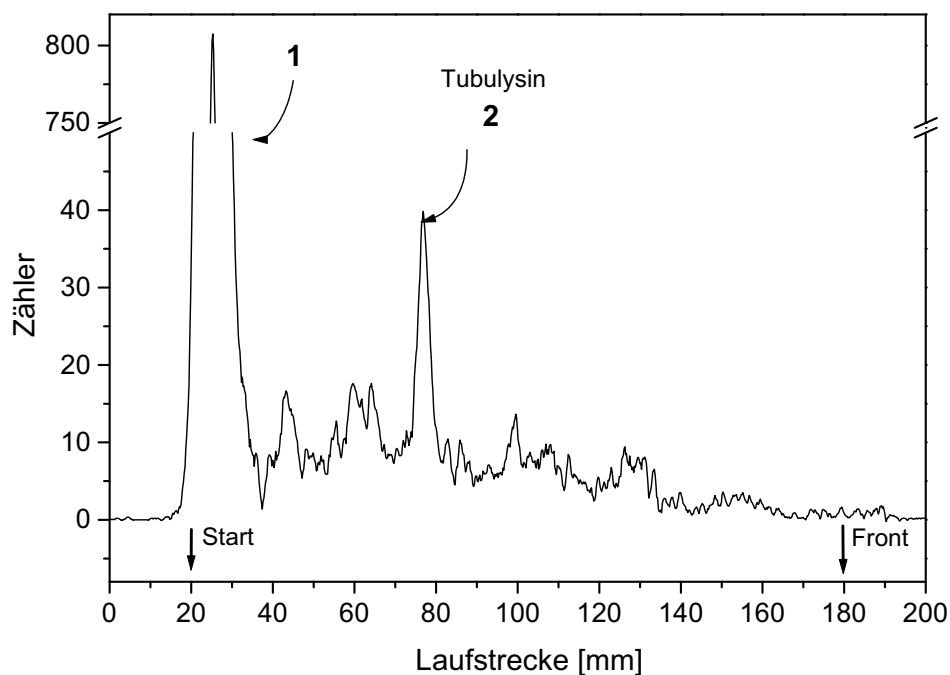
Abb. 25: Güte der Medienbestandteile im Griechisch-Lateinischen Quadrat II (C-Quellen, ; techn. Stickstoffquellen, ; Aminosäuren, ; pH-Wert, )

### 3.10 Radioaktiver Einbau von Aminosäuren in Tubuysin

Im folgenden sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt, verschiedene Substanzen in das Tubuysinmolekül einzubauen.

#### 3.10.1 $^{14}\text{C}$ -L-Tyrosin

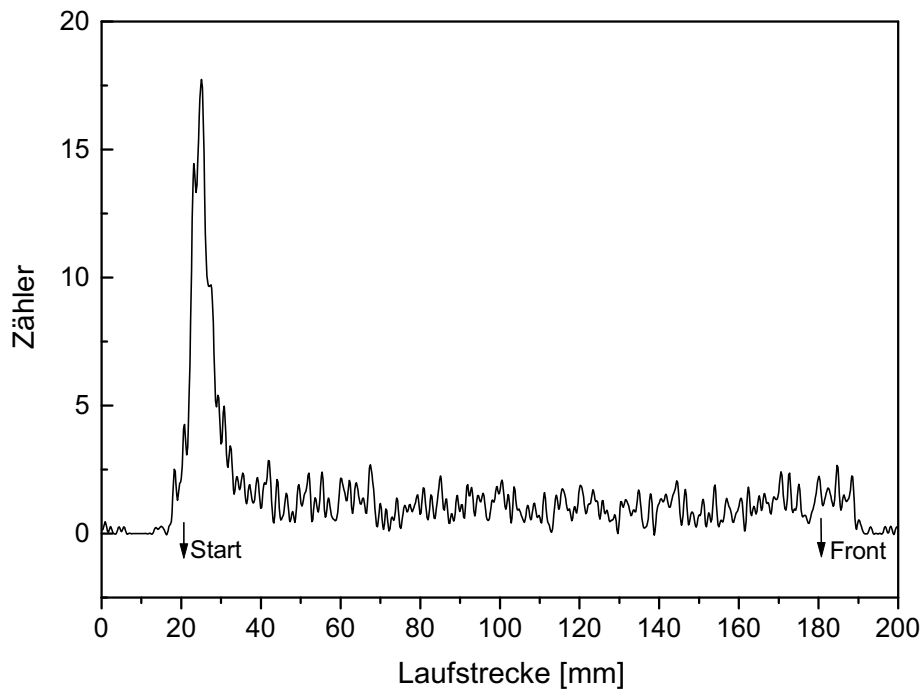
Die Analyse der Dünnschichtplatte nach Auftrennung des XAD-Extraktes des L-Tyrosin-Einbauversuches (siehe Abb. 26) zeigte mit 5 % der Gesamtzähler einen starken Peak in der Laufhöhe des Tubuylsins ( $R_f$  0,31). Der Großteil der Radioaktivität (Abb. 26, Peak 1: 75 % der Gesamtzähler) befand sich am Start des Chromatogramms. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem detektierten Fleck um Tubuylsin handelte, wurde der Fleck von der Dünnschichtplatte abgekratzt und zur weiteren Untersuchung in Methanol suspendiert. Sowohl die Analyse des UV-Spektrums als auch die charakteristische Wirkung im Cytotoxizitätstest entsprachen dem Tubuylsin.



**Abb. 26: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -L-Tyrosin**

### 3.10.2 $^{35}\text{S}$ -L-Cystein

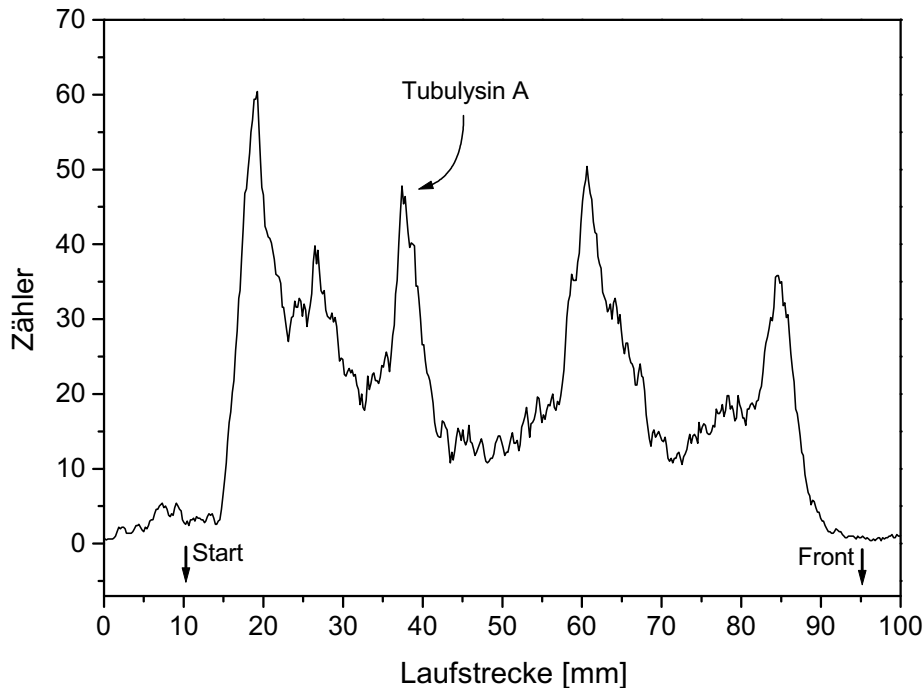
Der Einbau von  $^{35}\text{S}$ -L-Cystein konnte im Gegensatz zum L-Tyrosin nicht nachgewiesen werden. Die Dünnschichtanalyse (Abb. 27) zeigte lediglich einen deutlichen Peak am Start des Chromatogramms. Weiterhin fiel im Vergleich zum L-Tyrosinchromatogramm (Abb. 26) die niedrige Gesamtzählerzahl auf. Die maximale Peakhöhe im L-Tyrosinversuch betrug etwa 800 Zähler, im L-Cysteinversuch dagegen nur 18 Zähler.



**Abb. 27: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -L-Cystein**

### 3.10.3 $^{14}\text{C}$ -L-Lysin

Wie im Falle des L-Tyrosins konnte auch beim L-Lysin der Einbau in das Tubulysin A-Molekül nachgewiesen werden. Abb. 28 zeigt die Dünnschichtanalyse des XAD-Eluates. Von der Gesamtradioaktivität, die auf der Dünnschichtplatte gefunden wurde, hatte der Peak auf der Höhe des Tubulysin A einen Anteil von 27 %. Neben dem  $R_f$ -Wert diente auch hier ein Cytotoxizitätstest und das UV-Spektrum zur Identifizierung des Flecks als Tubulysin A.



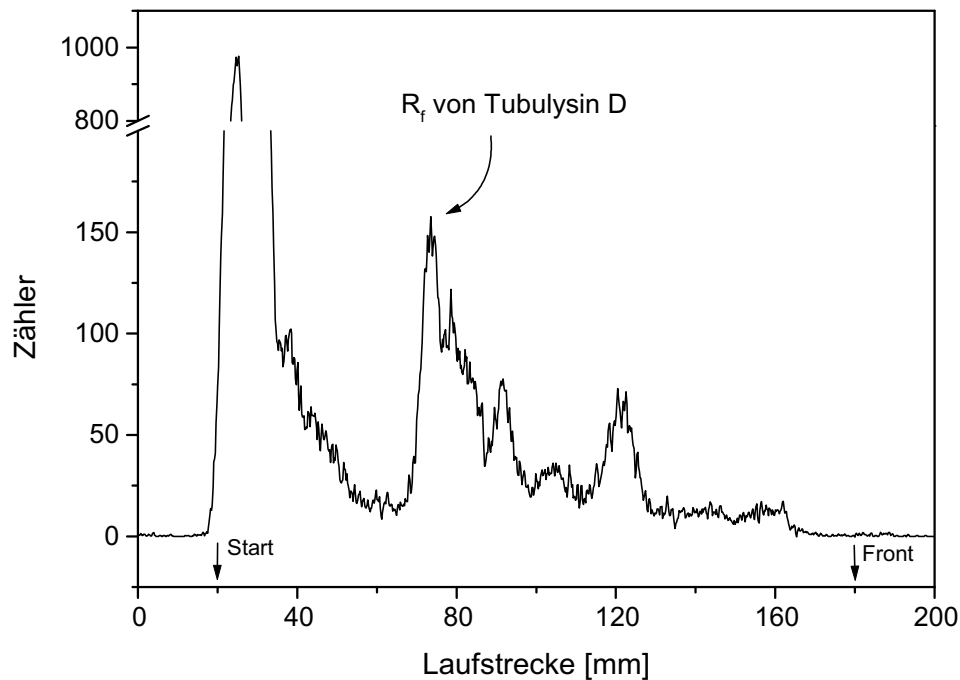
**Abb. 28: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -L-Lysin**

### 3.10.4 $^{14}\text{C}$ -L-Phenylalanin

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob der Stamm *Archangium gephyra* Ar315 Tubulysin D produziert. Tubulysin D (erstmalig isoliert aus *Angiococcus disciformis* An d26) unterscheidet sich vom Tubulysin A durch das Fehlen einer OH-Gruppe, die von einem Austausch von L-Tyrosin gegen L-Phenylalanin herrühren könnte. Aus diesem Grund wurde ein Einbauversuch mit L-Phenylalanin durchgeführt.

Die Analyse des zugehörigen Dünnschichtchromatogramms ist in Abb. 29 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist ein Peak bei der Laufstrecke des Tubulysin D ( $R_f$  0,35). Eine nachfolgende Analyse des zugehörigen Flecks zeigte aber, daß es sich hierbei nicht um das Tubulysin D, sondern um eine unbekannte Substanz mit gleichem Lauferhalten im verwendeten Dünnschichtsystem handelte. Am deutlichsten war dies im Cytotoxizitätstest zu erkennen. L-929-Zellen, die mit dem Methanolextrakt des abgekratzten Flecks behandelt wurden, zeigten keine morphologische Veränderung gegenüber der Methanolkontrolle.

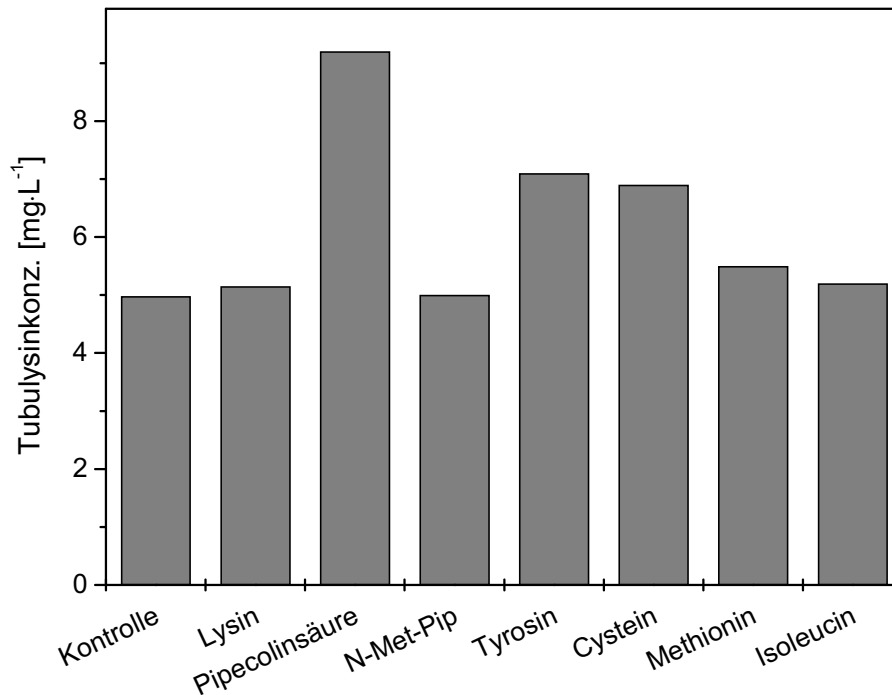




**Abb. 29: Radio-Chromatogramm eines XAD-Extraktes nach Kultivierung von Ar315 im Schüttelkolben unter Zugabe von  $^{14}\text{C}$ -L-Phenylalanin**

### 3.11 Einfluß von potentiellen Prekursoren auf die Tubulysinproduktion

In der folgenden Abbildung (Abb. 30) ist die Tubulysinkonzentration in Kulturen von *Archangium gephyra* dargestellt, die in M7Y-Medium unter Zugabe von  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  eines potentiellen Prekursors kultiviert wurden. Während sich die Tubulysinkonzentration nach Zugabe von L-Lysin, N-Methyl-Piperidin, L-Methionin oder L-Isoleucin nicht von der Konzentration im Kontrollansatz unterscheidet, erkennt man nach Zugabe von L-Tyrosin oder L-Cystein eine leichte Erhöhung der Tubulysinkonzentration. Durch die Zugabe von  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  D-L-Pipecolinsäure stieg die Konzentration deutlich von  $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $9,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .



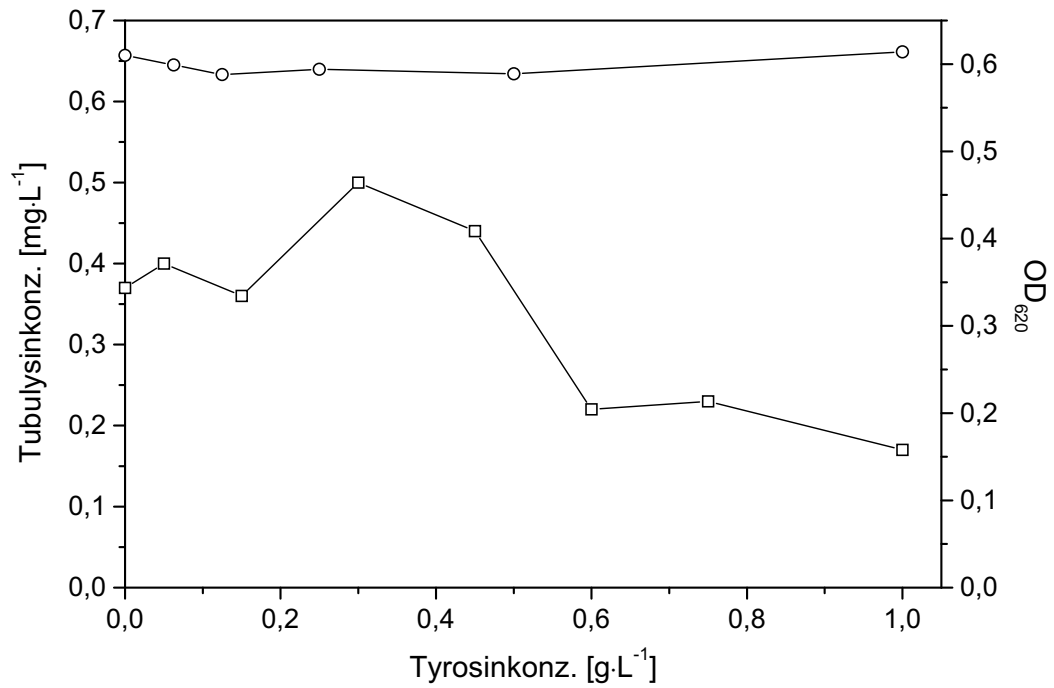
**Abb. 30: Tubulysinkonzentration nach Kultivierung im Schüttelkolben unter Zugabe von 0,5 g·L<sup>-1</sup> L-Lysin, D-L-Pipecolinsäure, N-Methylpiperidin, L-Tyrosin, L-Cystein, L-Methionin oder L-Isoleucin**

### 3.11.1 L-Tyrosin

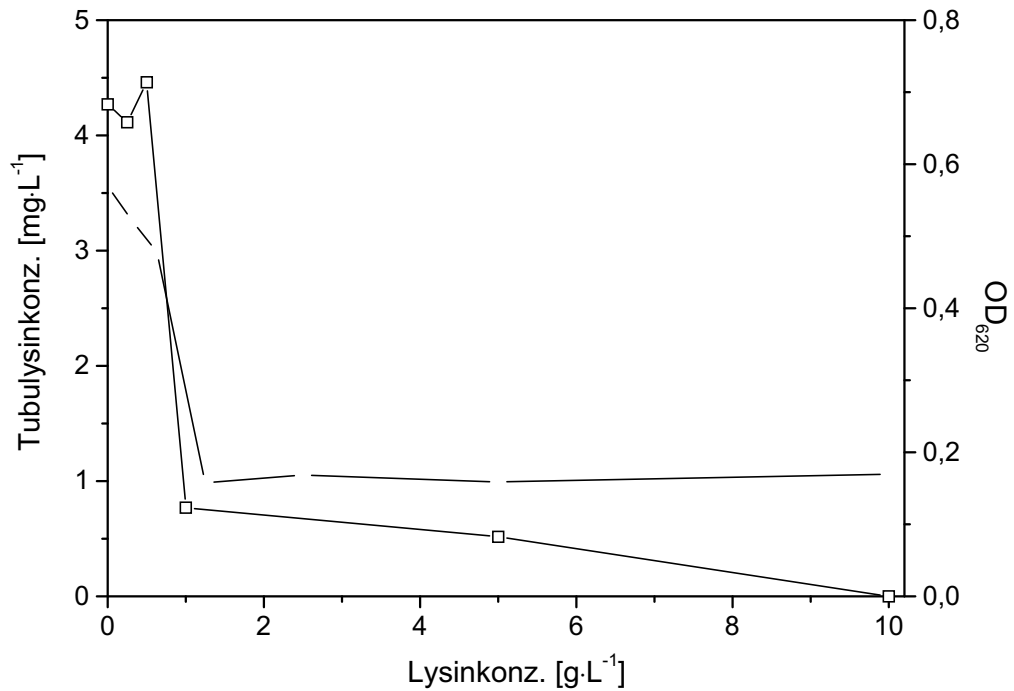
In Abb. 31 ist zu erkennen, daß die Tubulysinproduktion bei einer L-Tyrosinkonzentration von 0,3 mg·L<sup>-1</sup> am höchsten war. Außerdem ist die optische Dichte von homogenen Ar315-Kulturen, die mit unterschiedlichen L-Tyrosinkonzentrationen kultiviert wurden, aufgetragen. Im untersuchten L-Tyrosin-Konzentrationsbereich bleibt die optische Dichte konstant. Es ist kein wachstumshemmender Effekt zu beobachten.

### 3.11.2 L-Lysin

Im Gegensatz zum L-Tyrosin zeigt sich bei der Zugabe von L-Lysin schon bei einer Konzentration von 0,3 g·L<sup>-1</sup> ein leichte Wachstumshemmung (Abb. 32). Die minimale Hemmkonzentration für L-Lysin liegt bei 1 g·L<sup>-1</sup>. Bei dieser Konzentration brach die Tubulysinproduktion im Medium (XAD-Eluat) ebenfalls zusammen. Die Ausbeute bei einer L-Lysinkonzentration von 0-0,5 g·L<sup>-1</sup> lag bei 4,1-4,4 mg·L<sup>-1</sup> Tubulysin und fiel bei einer L-Lysinkonzentration von 1 g·L<sup>-1</sup> auf 0,75 mg·L<sup>-1</sup> ab (Abb. 32).



**Abb. 31: Tubulysinkonzentration (□) und optische Dichte (○) von Ar315-Kulturen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von L-Tyrosin**



**Abb. 32: Tubulysinkonzentration (□) und optische Dichte (○) von Ar315-Kulturen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von L-Lysin**

### 3.11.3 D-L-Pipecolinsäure

Bei Zugabe von D-L-Pipecolinsäure stellten sich im untersuchten Konzentrationsbereich keine wachstumshemmenden Effekte ein. Die optische Dichte der Kulturen blieb im Bereich von 0-1,25 g·L<sup>-1</sup> D-L-Pipecolinsäure unverändert (Abb. 33). Im Gegensatz zur Kontrolle stieg die Tubulysinkonzentration nach Zugabe von 0,05 g·L<sup>-1</sup> D-L-Pipecolinsäure von 5,5 mg·L<sup>-1</sup> auf 7,2 mg·L<sup>-1</sup>. Bei Erhöhung der D-L-Pipecolinsäurekonzentration sank die Tubulysin-konzentration zunächst wieder, um dann bei 0,45 g/L ein weiteres Optimum zu erreichen (Abb. 33). Dieses zunächst ungewöhnlich erscheinende Ergebnis konnte durch mehrfache Wiederholung bestätigt werden.

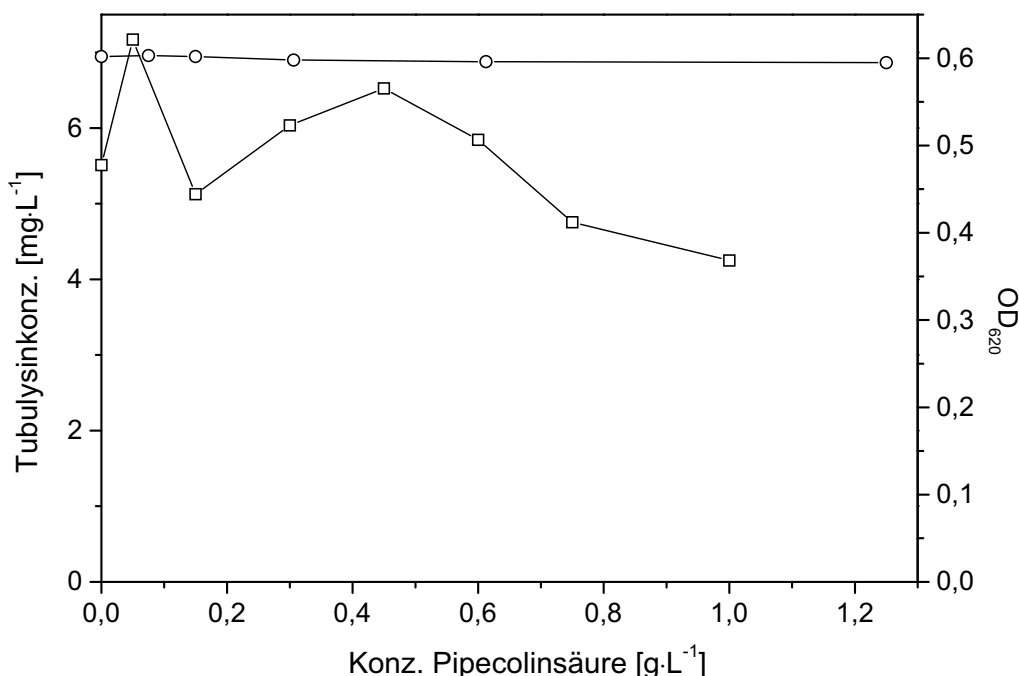


Abb. 33: Tubulysinkonzentration (□) und optische Dichte (○) von Ar315-Kulturen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von D-L-Pipecolinsäure

## 3.12 Genetischer Algorithmus zur Optimierung der Konzentrationsverhältnisse von Aminosäuren

Tabelle 12 stellt die Ergebnisse zur Optimierung der Aminosäurekonzentrationen dar, die mit der Methode des genetischen Algorithmus ermittelt wurden. Die Angaben entsprechen dem Ergebnis mit dem Programm GALOP und sind demnach Stammlösungsvolumina, die in die entsprechenden Kulturkolben pipettiert wurden. Die Spalte ‚Tubulysinkonz.‘ enthält die Tubulysinkonzentrationen in mg·L<sup>-1</sup>, die nach Kultivierung in den Medien nach XAD-Elution

ermittelt wurden. Zur besseren Übersicht sind die Konzentrationsangaben des jeweils besten Mediums im Verlauf der Optimierung in Abb. 34 dargestellt.

Anhand von Tabelle 12 läßt sich der Ablauf und die typischen Merkmale der Methode erkennen. Zum einen erkennt man, daß das jeweils beste Medium in die nächste Generation übernommen wurde (vgl. z.B. Tabelle 12, Lfd. Nr. 3 -> Lfd. Nr. 9). Desweiteren erkennt man, daß gute Medien sich bevorzugt an der nächsten Generation beteiligen und schlechte Medien weniger starken Einfluß haben. Zum Beispiel sind die drei Medien, die in der ersten Generation zu einer Tubulysinkonzentration von Null führen (alle drei Medien zeichnen sich durch eine sehr niedrige D-L-Pipecolinsäurekonzentration aus), nicht in der zweiten Generation vertreten. Ein weiteres typisches Element der Methode des genetischen Algorithmus sind die Crossover. Zum Beispiel führt ein Crossover der Medien Lfd. Nr. 18 und 19 in Generation 3 zu den Medien Lfd. Nr. 27 und 32 in Generation 4 (siehe dazu ebenfalls Tabelle 12).

**Tabelle 12: Entwicklung der Aminosäuregehalte im Verlauf der Optimierung mit dem Genetischen Algorithmus und resultierende Tubulysinkonzentrationen. Angegeben sind die zugesetzten Volumina der Stammlösungen (vgl. Material und Methodenteil 2.8.4)**

Lfd. Nr.	Medium	D-L-Pipecolinsäure [µL]	L-Tyrosin [µL]	L-Cystein [µL]	L-Isoleucin [µL]	Tubulysinkonz. [mg·L <sup>-1</sup> ]
<b>Generation 1</b>						
1	1	20	670	710	1070	0,00
2	2	550	1130	440	230	2,22
3	3	950	1130	360	1780	2,23
4	4	1250	1570	920	1390	1,21
5	5	590	820	830	0	1,81
6	6	50	710	390	420	0,00
7	7	70	920	1190	1750	0,00
8	8	510	470	1130	1230	0,82
<b>Generation 2</b>						
9	1	950	1130	360	1780	1,85
10	2	590	630	360	380	0,74
11	3	240	1570	920	1220	2,02
12	4	1070	920	1190	1250	1,98
13	5	550	1130	450	0	1,24

14	6	590	820	820	230	0,43
15	7	750	1570	920	1210	0,75
16	8	1450	1130	360	1390	0,51

**Generation 3**

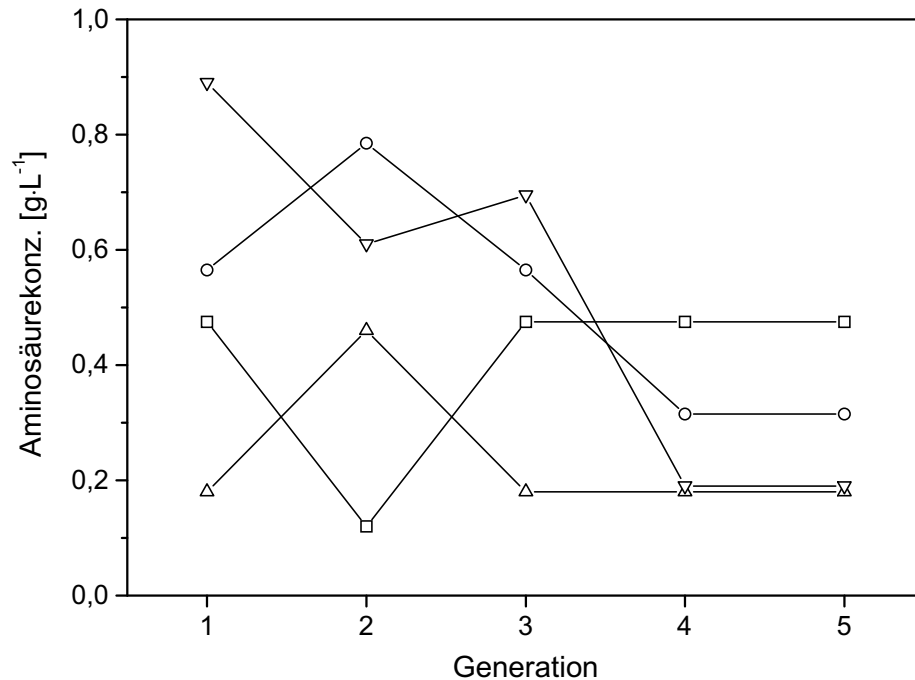
17	1	240	1570	920	1220	2,65
18	2	950	1130	360	1390	3,48
19	3	240	630	360	380	2,74
20	4	950	1130	490	1390	2,62
21	5	180	1570	920	1220	2,41
22	6	590	630	450	0	2,33
23	7	560	1130	360	130	2,85
24	8	590	1570	920	1220	2,17

**Generation 4**

25	1	950	1130	360	1390	3,54
26	2	240	1570	920	1220	3,27
27	3	240	1130	360	1390	3,74
28	4	240	1570	790	1220	3,44
29	5	180	630	360	380	2,53
30	6	950	1130	920	1220	3,98
31	7	170	1570	360	1140	3,14
32	8	950	630	360	380	4,15

**Generation 5**

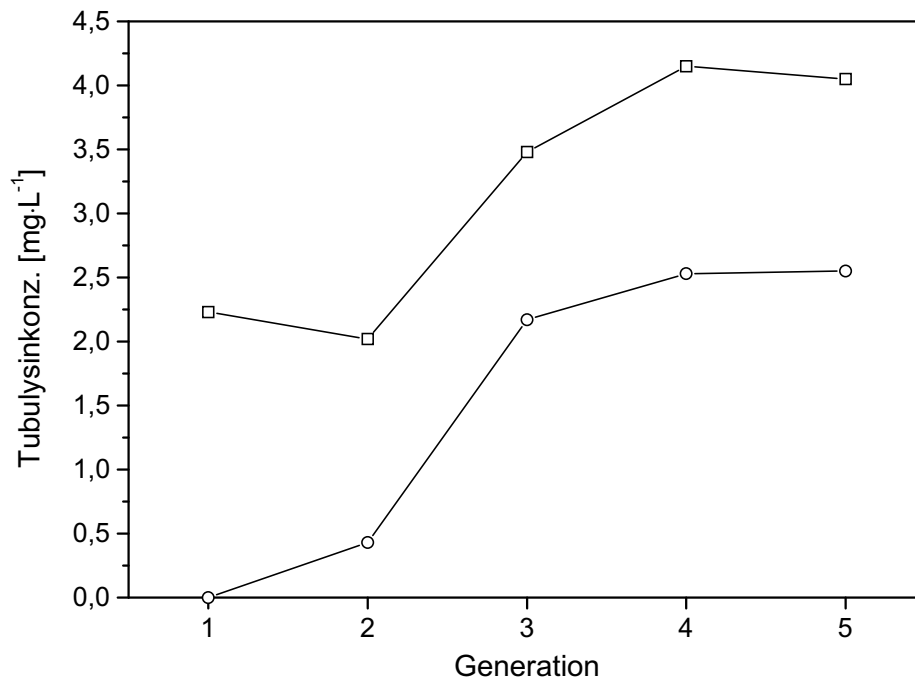
33	1	950	630	360	380	4,05
34	2	950	1130	360	1390	3,48
35	3	240	1570	920	1220	3,70
36	4	950	1130	490	1390	3,59
37	5	180	1130	360	1380	3,65
38	6	240	1570	360	380	3,14
39	7	170	630	920	1470	2,55
40	8	240	1130	360	1390	3,20



**Abb. 34: Aminosäurekonzentrationen des jeweils besten Mediums im Verlauf der Optimierung mit dem Genetischen Algorithmus; D-L-Pipecolinsäure (□), L-Tyrosin (○), L-Cystein (Δ), L-Isoleucin (▽)**

In Abb. 34 ist der Verlauf der Aminosäurekonzentrationen während der Optimierung mit dem genetischen Algorithmus dargestellt. Auffällig ist, daß die L-Isoleucinkonzentration im Verlauf der Optimierung von  $0,89 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $0,19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  abfiel. Die L-Tyrosinkonzentration stieg zunächst kurz an, fiel dann aber auch ab (von  $0,785 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $0,315 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Die Konzentrationen der Aminosäuren D-L-Pipecolinsäure und L-Cystein in den jeweils besten Medien veränderten sich nur in der Generation 2 merklich. Ansonsten lag die Konzentration der D-L-Pipecolinsäure bei  $0,475 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  und die L-Cysteinkonzentration bei  $0,18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Die Tubulysinkonzentration des jeweils besten Mediums blieb im Verlauf der Optimierung zunächst konstant, stieg ab der zweiten Generation aber von  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $4,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  an (siehe dazu Abb. 35). In der Startgeneration tauchten noch Medien auf, die zu einer nicht meßbaren Tubulysinkonzentration führten. Aber schon ab der zweiten Generation wurden auch in den schlechtesten Medien Tubulysin produziert.



**Abb. 35: Tubulysinkonzentration des jeweils besten (□) und des jeweils schlechtesten (○) Mediums im Verlauf der Optimierung mit dem Genetischen Algorithmus**

### 3.13 Kohlenhydratverbrauch

Unterschiedliche Kohlenhydratquellen führten beim Wachstum von Ar315 zu unterschiedlich hohen Zelldichten. Wie in Abb. 36 zu erkennen ist, wurde im Kontrollansatz ohne Zugabe von zusätzlichen Kohlenhydratquellen oder auch bei Zugabe von Glukose eine maximale Zellzahl von  $4 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$  erzielt. Innerhalb der folgenden zwei Tage, bis 89 h, sank die Zellzahl dann auf  $1,5 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . Bei Zugabe von Stärke und Glukose wurde nach 63 h eine maximale Zelldichte von  $5,7 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$  erreicht, nach 90 h betrug sie noch  $3,5 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$  und war damit zum Ende der Fermentation mehr als doppelt so hoch wie im Kontrollansatz.

Bei der Zugabe von Stärke ohne Glukose zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 37). Im Vergleich zum Ansatz mit Maltose blieb die Zellzahl in der stationären Phase länger auf einem hohen Niveau. Auch im Ansatz mit Maltotriose wurde wie im Stärkeansatz eine Zellzahl von  $4,4 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$  erzielt, und diese ging bis zum Abbruch der Fermentation auf  $3 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$  zurück.



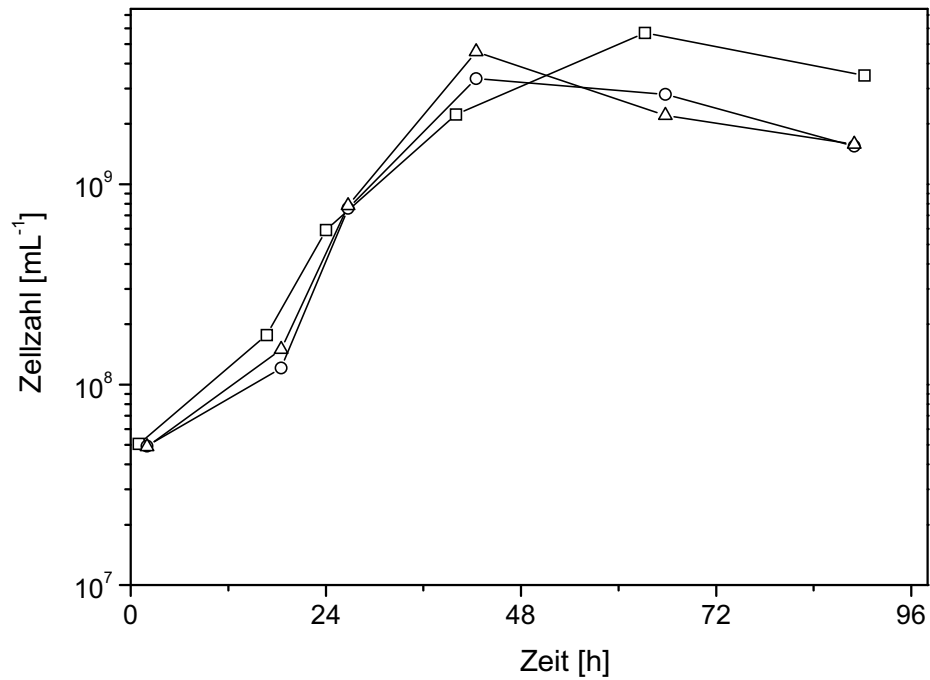


Abb. 36: Zellzahl im Verlauf der Kultivierung von Ar315 K4.7 unter Zugabe von Glukose (○), Stärke und Glukose (□) oder ohne zusätzliche C-Quelle (Δ)

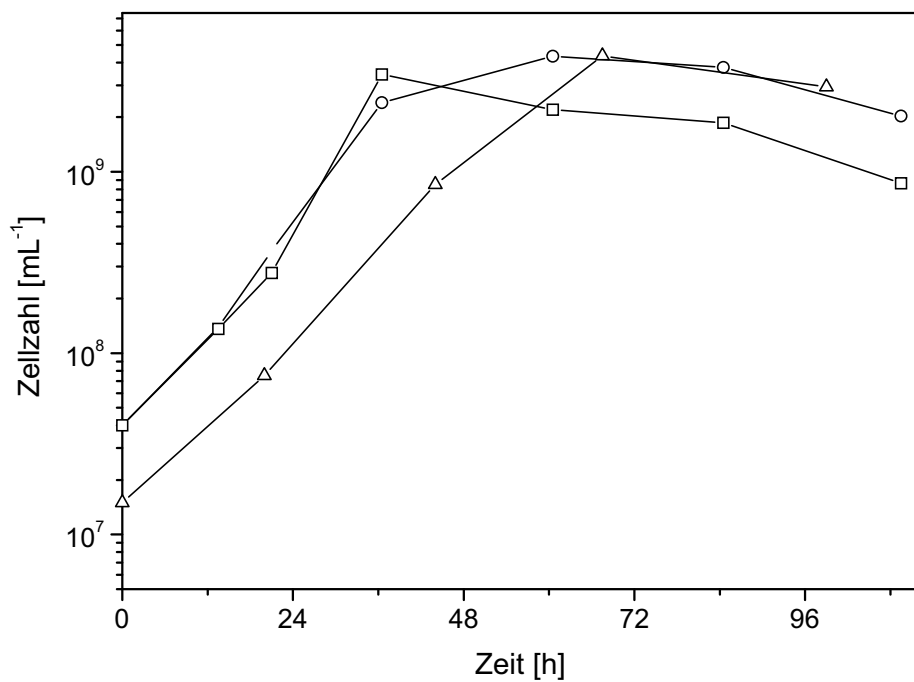
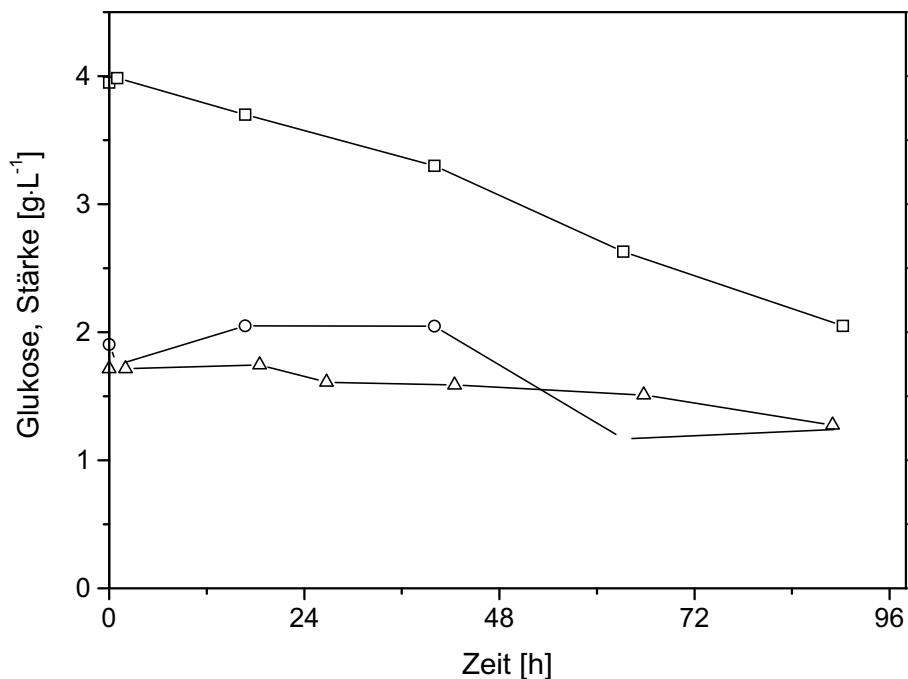


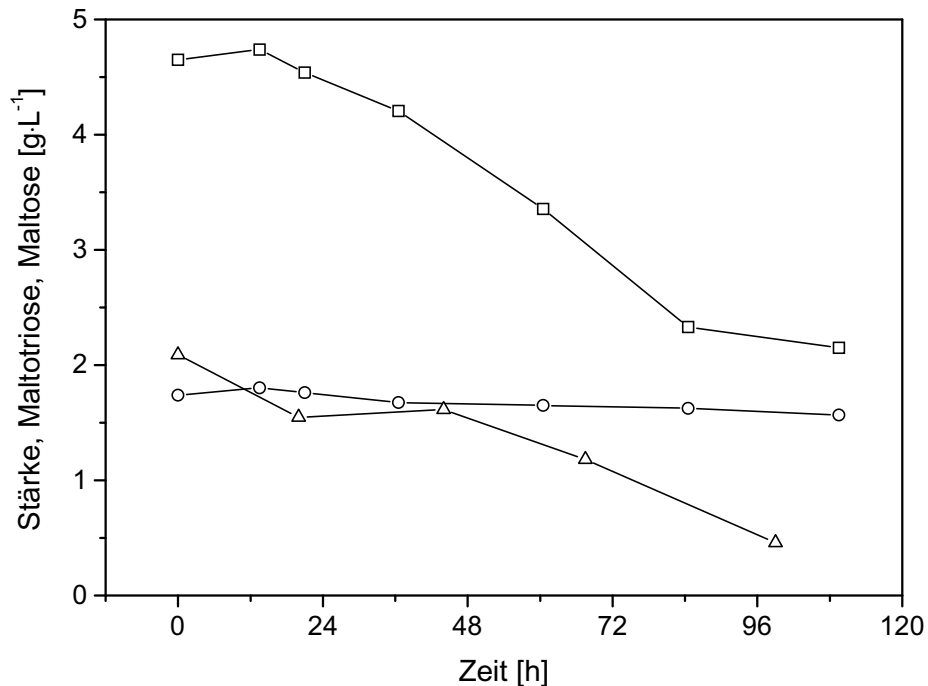
Abb. 37: Zellzahl im Verlauf der Kultivierung von Ar315 K4.7 unter Zugabe von Stärke (○), Maltose (□) oder Maltotriose (Δ)

Sowohl im Ansatz mit Stärke als auch im Ansatz mit Stärke und Glukose verringerte sich die Stärkekonzentration im Verlauf der Fermentation von 4 auf 2 g·L<sup>-1</sup> deutlich (Abb. 38, Abb. 39). Im Gegensatz dazu war im Ansatz mit Glukose nur eine leichte Abnahme der Glukosekonzentration von 1,7 auf 1,3 g·L<sup>-1</sup> zu verzeichnen (Abb. 38). Die Konzentration der freien Glukose im Ansatz mit Stärke und Glukose stieg zunächst von 1,8 g·L<sup>-1</sup> auf 2 g·L<sup>-1</sup> an, fiel dann zum Ende der Kultivierung aber auf 1,2 g·L<sup>-1</sup>.

Die Maltosekonzentration im Ansatz mit Maltose veränderte sich im Verlauf der Kultivierung kaum (Abb. 39). Sie sank nur leicht von 1,8 g·L<sup>-1</sup> auf 1,6 g·L<sup>-1</sup>. Im Maltotrioseansatz war aber eine deutliche Verringerung der Kohlenhydratkonzentration zu erkennen. Die Maltotriosekonzentration nahm bis zum Ende der Kultivierung auf einen Wert von 0,45 g·L<sup>-1</sup> ab (Abb. 39).



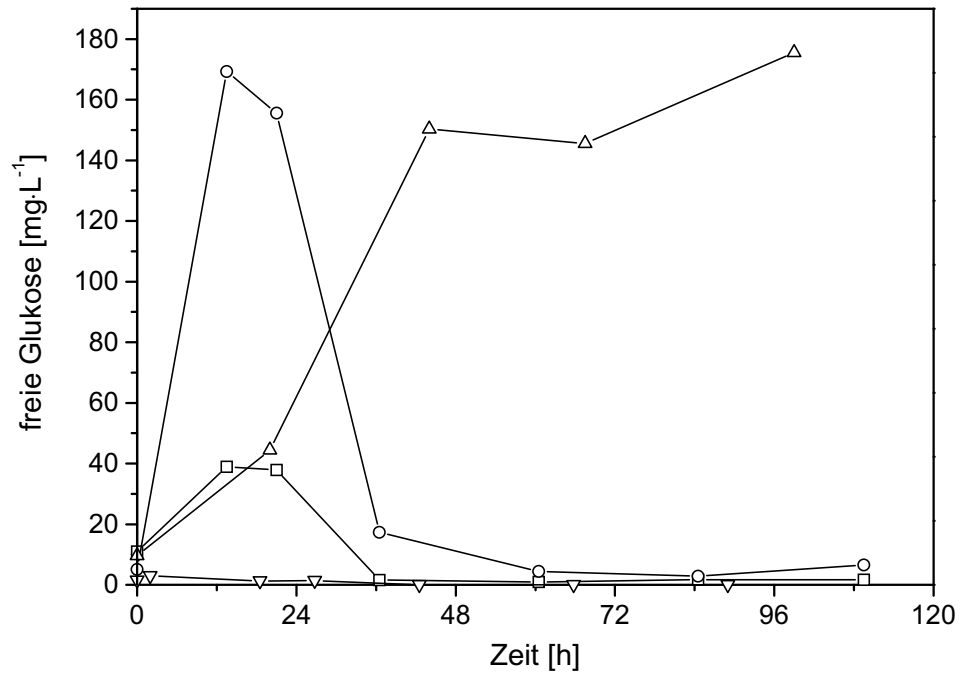
**Abb. 38:** Kohlenhydratkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung von Ar315, I: Stärke- (□) und Konzentration der freien Glukose (○) im Ansatz mit Stärke und Glukose, Konzentration der freien Glukose im Ansatz mit Glukose (Δ).



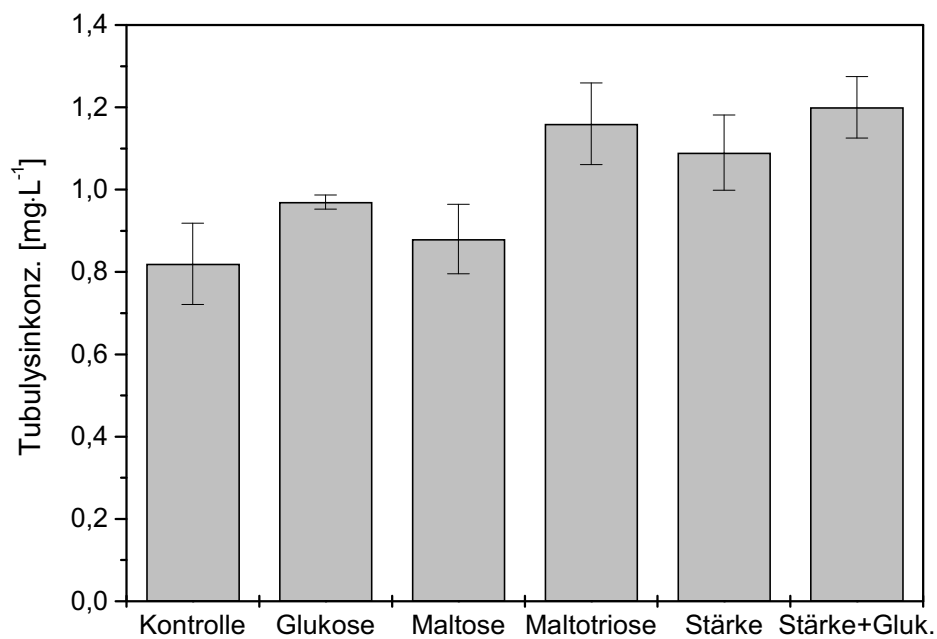
**Abb. 39: Kohlenhydratkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung von Ar315, II: Stärkekonzentration im Ansatz mit Stärke (□), Maltosekonzentration im Ansatz mit Maltose (○) und Maltotriosekonzentration im Ansatz mit Maltotriose (△).**

Im Stärkeansatz stieg die Konzentration der freien Glukose nach 13 h kurzfristig auf  $170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  und fiel dann nach 36 h auf unter  $17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Konzentration der freien Glukose im Maltoseansatz. Hier stieg die Konzentration kurzfristig aber nur auf  $39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Anders verlief die Glukosekonzentration im Ansatz mit Maltotriose. Nach einem Anstieg auf  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  innerhalb der ersten 40 h blieb die Konzentration hier bis zum Abbruch der Kultivierung auf diesem Niveau. Im Kontrollansatz betrug die Glukosekonzentration weniger als  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Abb. 40).

In Abb. 41 sind die Tubulysinkonzentrationen der Ansätze mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen dargestellt. Die Tubulysinkonzentrationen im Kontrollansatz, im Ansatz mit Glukose und im Maltoseansatz lagen mit  $0,8\text{-}1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  leicht unter den Tubulysinkonzentrationen der Ansätze mit Maltitriose, Stärke oder Stärke + Glukose, die  $1,1\text{-}1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  betrugen.



**Abb. 40:** Konzentration freier Glukose in Kulturen von Ar315 mit Stärke (○), Maltose (□), Maltotriose (△) und im Kontrollansatz (▽).



**Abb. 41:** Tubulysingehalt in Kulturen von Ar315 mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen.

### 3.14 Technische Untersuchungen an Bioreaktoren

#### 3.14.1 Sauerstoffübergangsrate im Laborbioreaktor

In Abb. 42 ist die Sauerstoffübergangsrate im 6-L-Bioreaktor dargestellt, die mit der Sulfit-oxidationsmethode bestimmt wurde. Mit steigender Rührerdrehzahl stieg die Sauerstoffübergangsrate immer stärker an und erreichte bei einer Drehzahl von  $800 \text{ min}^{-1}$  einen Wert von  $90 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Der aus der Sauerstoffübergangsrate unter Berücksichtigung der jeweiligen Sauerstoffkonzentration in der Abluft berechnete volumetrische Sauerstoffübergangskoeffizient  $K_L a$  zeigte bei steigender Drehzahl den gleichen Verlauf und erreichte bei  $800 \text{ min}^{-1}$  einen Wert von  $0,146 \text{ s}^{-1}$ .

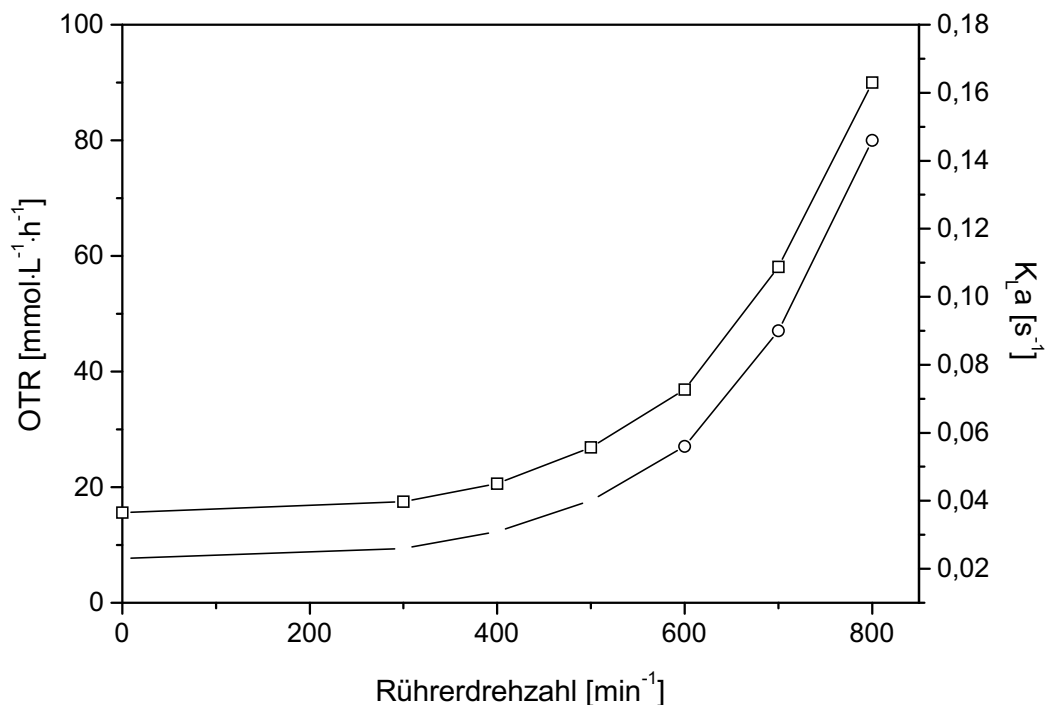
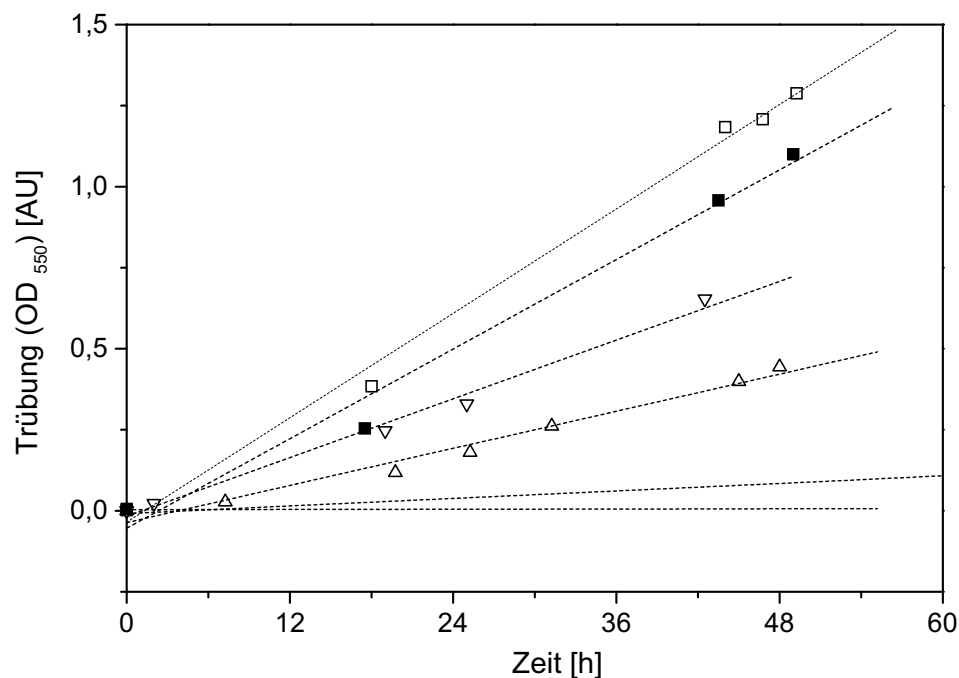


Abb. 42: Sauerstoffübergangsrate ( $\square$ , OTR) und volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient ( $\circ$ ,  $K_L a$ ) im 6-L-Bioreaktor in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl (Lufteintrag:  $1,2 \text{ vvm}$ )

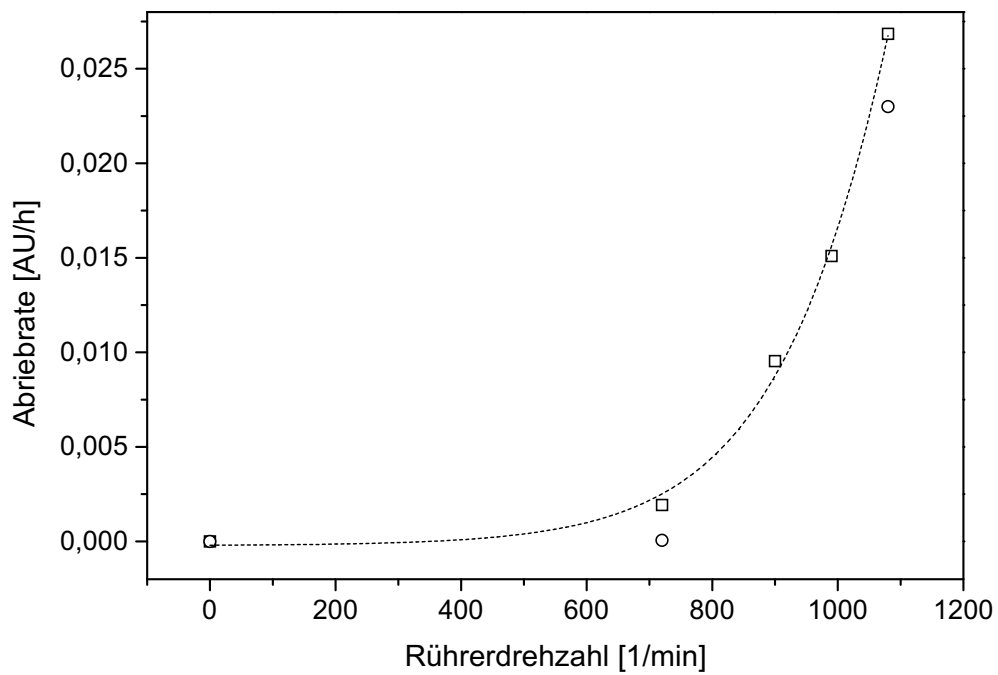
### 3.14.2 Adsorberharz-Abrieb im 6-L-Bioreaktor

Im Verlauf der Zeit konnte im 6-L-Bioreaktor ein Abrieb des Adsorberharzes XAD-16 festgestellt werden, welcher sich in einer erhöhten optischen Dichte des Überstandes nach Absieben der Harzpartikel zeigte (Abb. 43). Die Trübungszunahme verlief linear mit der Kultivierungsdauer. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden aus Abb. 43 sind in Abb. 44 als Abriebrate aufgetragen. Die Abriebrate stieg mit steigender Rührerdrehzahl exponentiell an. Höhere Drehzahlen als  $720 \text{ min}^{-1}$  sind danach wenig sinnvoll. Außerdem zeigt Abb. 44, daß die Abriebrate im belüfteten System (1,2 vvm) niedriger war als im unbelüfteten System.

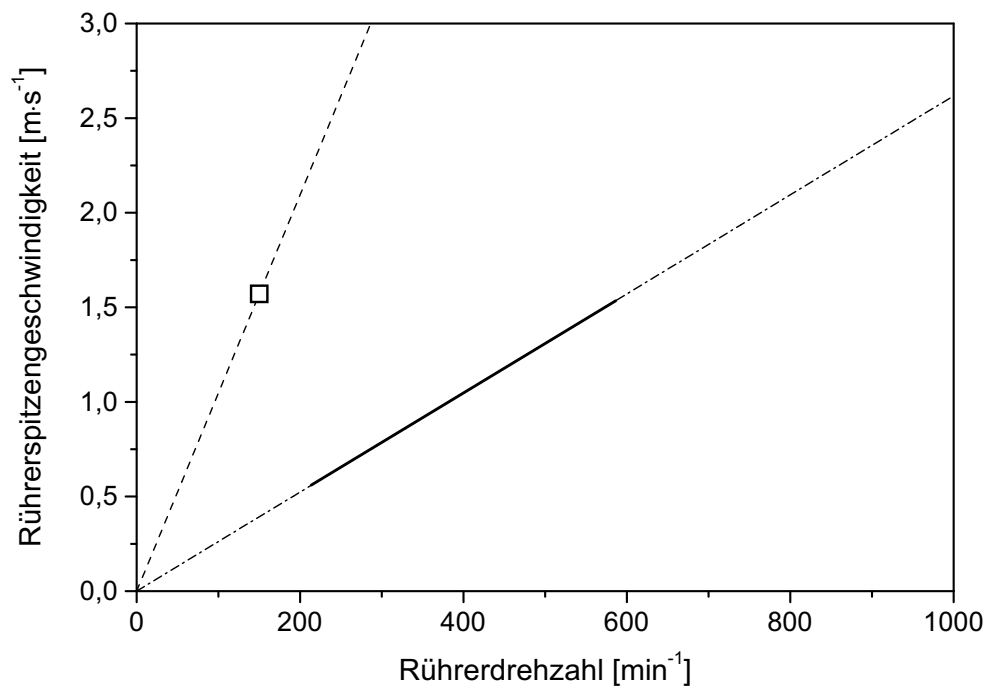
Um die Erkenntnisse aus den Versuchen im Laborbioreaktor auf die Bedingungen im 300-L-Maßstab übertragen zu können, wurden die Rührerspitzengeschwindigkeiten der beiden Systeme verglichen. Abb. 45 zeigt die berechneten Rührerspitzengeschwindigkeiten des Laborbioreaktors und des 300-L-Technikumsbioreaktors bei unterschiedlichen Drehzahlen sowie den gewählten Betriebsbereich bzw. Betriebspunkt.



**Abb. 43: Trübungsverlauf im 6-L-Bioreaktor als Maß für den XAD-Abrieb bei unterschiedlichen Drehzahlen (□, ■, 1080 UpM; ▽, 990 UpM; △, 900 UpM; ○, ●, 720 UpM) ohne (□, ○, △, ▽) oder mit 1,2 vvm Belüftung (■, ●)**



**Abb. 44:** Einfluß der Rührerdrehzahl auf den XAD-Abrieb im 6-L-Bioreaktor (□, ohne Begasung; ○, mit 1,2 vvm Belüftung)



**Abb. 45:** Rührerspitzen Geschwindigkeiten im 6-L-Laborbioreaktor (---) und im 300-L-Bioreaktor (—) in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl sowie gewählter Drehzahlbereich im Laborbioreaktor (○—○) und Betriebspunkt im 300-L-Bioreaktor (□)

### 3.14.3 Vergleich der Probennahmesysteme im Laborbioreaktor und im 300-L-Technikumsbioreaktor

In Abb. 46 ist das Verhältnis von Probenvolumen und dem XAD-Volumen, welches in der Probe zu finden war, sowohl für den 6-L-Laborbioreaktor als auch für den 300-L-Technikumsbioreaktor dargestellt. Idealerweise sollten sich die Punkte auf der Diagonalen befinden, die dem Soll-XAD-Anteil von 2 % (v/v) entspricht. In beiden Reaktoren kam es zu einem leichten Mißverhältnis. In den Proben des Laborbioreaktors war im Mittel ein höheres XAD-Volumen als erwartet, in den Proben des 300-L-Bioreaktors war es tendenziell niedriger. Daher wurde in beiden Fällen das extrahierte XAD-Volumen als Bezugsvolumen für die Tubulysinberechnung gewählt und anschließend auf das entsprechende Kulturvolumen umgerechnet.

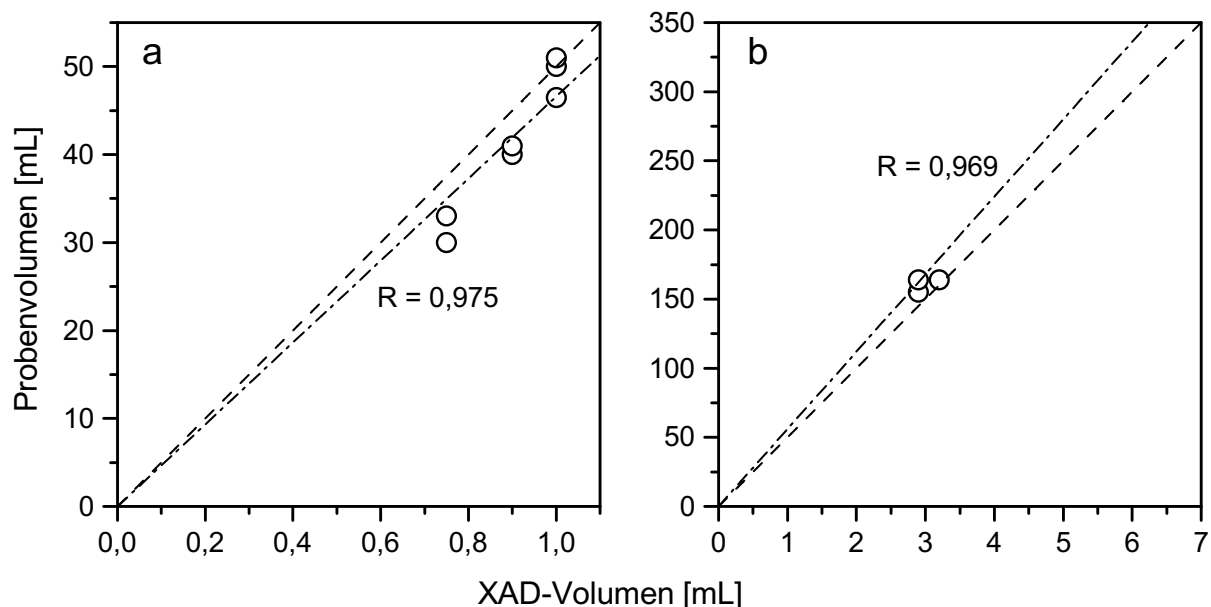


Abb. 46: Korrelation zwischen Probenvolumen und XAD-Volumen der Probe im 6-L-Laborbioreaktor (a) und im Technikumsbioreaktor F350.1 (b); Sollverhältnis bei 2 % (v/v) XAD im Medium (— —); Ausgleichsgerade (— · — ·)

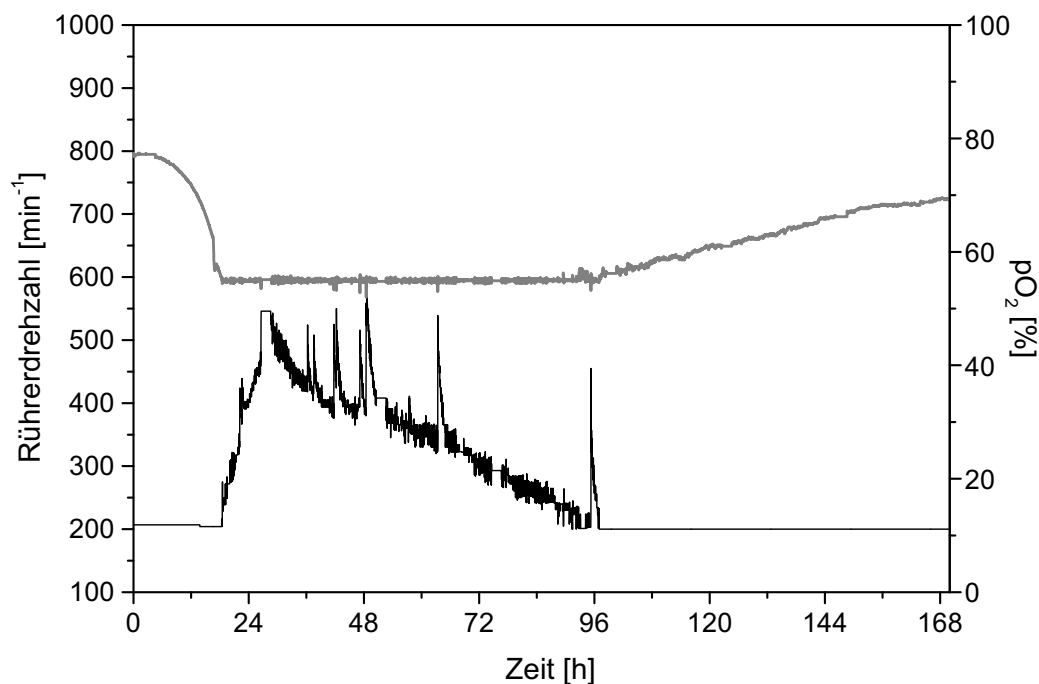
## 3.15 Fermentationen im 4,5-L-Maßstab

### 3.15.1 Änderung des Sauerstoffpartialdrucks

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse von drei Fermentationen (F1-F3) im 4,5-L-Maßstab dargestellt, die mit unterschiedlichen Sollwerten für den Sauerstoffpartialdruck durchgeführt



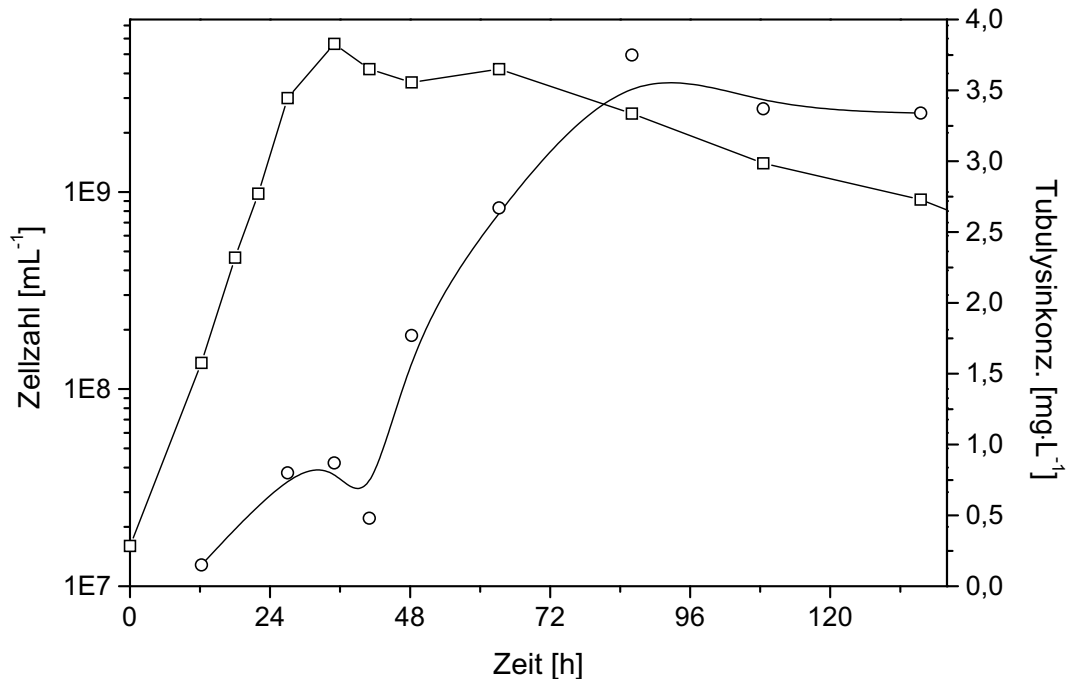
wurden. Die Regelung erfolgte über die Rührerdrehzahl. Die Belüftungsrate und weitere Variations- und Standardparameter sind im Material- und Methodenteil aufgeführt (vgl. Tabelle 3). Der Verlauf des Sauerstoffgehalts und der Rührerdrehzahl während der Fermentation mit einem  $pO_2$ -Sollwert von 55 % ist in Abb. 47 dargestellt. Innerhalb der ersten 18 h der Kultivierung fiel der Sauerstoffpartialdruck auf 55 % ab. Ab diesem Zeitpunkt erhöhte sich die Rührerdrehzahl, so daß der  $O_2$ -Partialdruck auf 55 % gehalten wurde. Die Drehzahl stieg bis zu einem Wert von 550 UpM nach 27 h an. Ab diesem Zeitpunkt fiel die Drehzahl wieder bis auf den Minimalwert von 200 UpM nach 96 h zurück. Der Sauerstoffpartialdruck konnte ab hier nicht mehr auf 55 % gehalten werden und stieg bis zum Abbruch der Fermentation nach 180 h. Weiterhin fallen in Abb. 47 Peaks in der Drehzahlkurve auf. Zu den Zeitpunkten, an denen die Rührerdrehzahl stark anstieg, wurde manuell Antischaummittel zudosiert.



**Abb. 47: Rührerdrehzahl (—) und Sauerstoffgehalt (—) im Verlauf einer 4,5-L-Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 55 %**

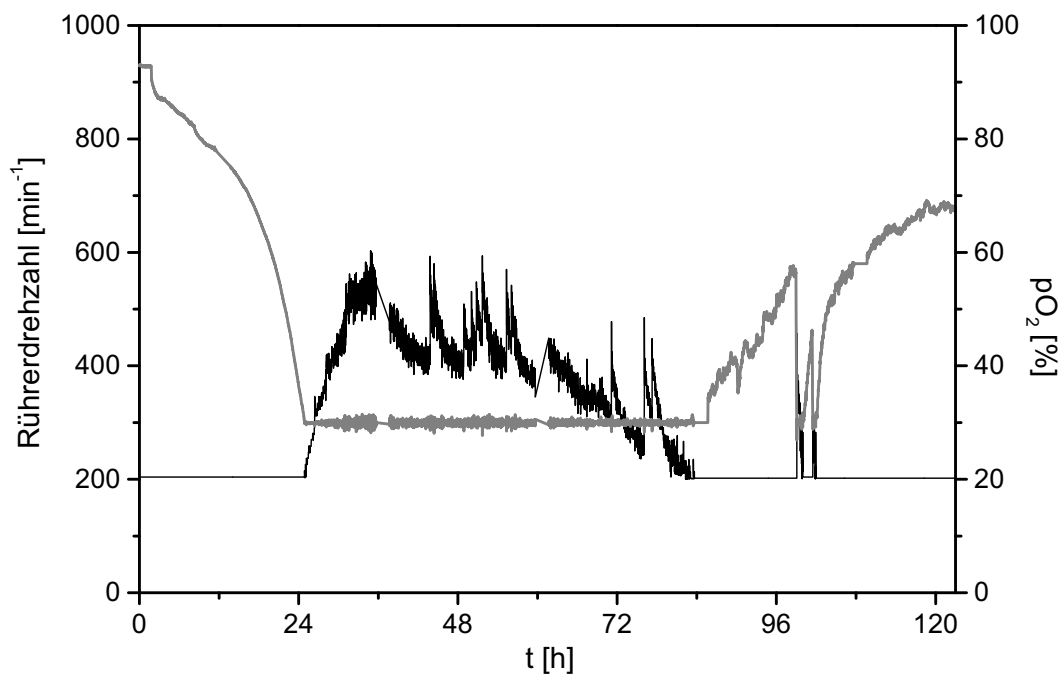
Abb. 48 zeigt die Zellzahl und die Tubulysinkonzentration im Verlauf der Fermentation mit einem  $pO_2$ -Sollwert von 55 %. Die Zellzahl stieg innerhalb der ersten 35 h auf  $5,7 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . Sie sank dann etwas ab und verblieb bis 63 h nach Animpfen auf  $4,2 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . Im weiteren Verlauf nahm die Zellzahl dann kontinuierlich ab.

Der starke Anstieg im Verlauf der Tubulysin-konzentration stellte sich nach 41 h zeitversetzt zum Anstieg der Zellkonzentration, also in der stationären Wachstumsphase ein. Die Tubulysin-endkonzentration lag bei einer Sauerstoffsättigung von 55 % bei  $3,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

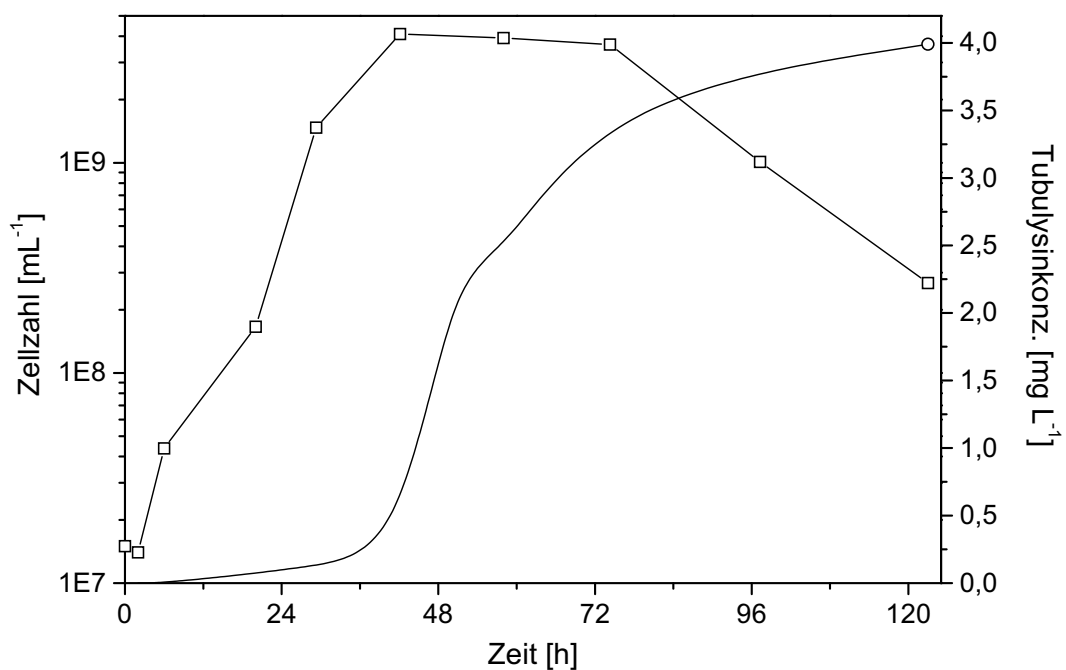


**Abb. 48: Zellzahl (□) und Tubulysin-konzentration (○) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 55 %**

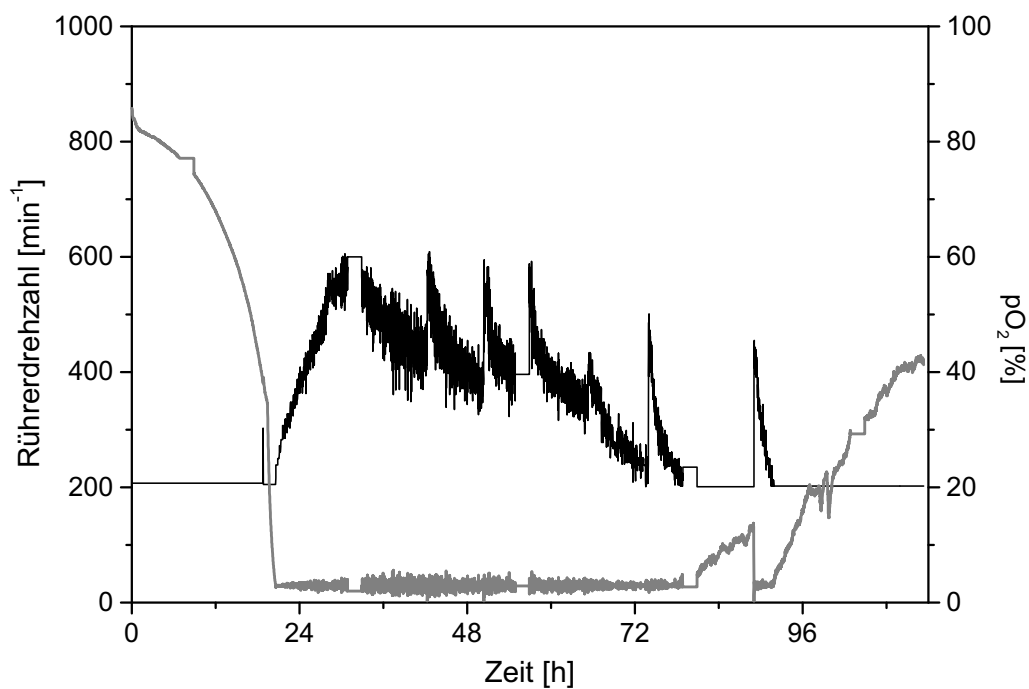
In Abb. 49 bis Abb. 52 ist die Rührerdrehzahl, der Sauerstoffpartialdruck, die Zellkonzentration sowie die Tubulysin-konzentration für die Fermentationen mit 30 % bzw. mit 3 %  $\text{pO}_2$  dargestellt. Der Verlauf der Kurven ähnelt dem Verlauf bei 55 % Sauerstoffpartialdruck (siehe dazu Abb. 47 und Abb. 48). Auch bei den voreingestellten Werten 30 % bzw. 55 % Sauerstoffsättigung konnte mit den gewählten Regelungsparametern der Sollwert über eine lange Phase von 60 h gehalten werden. Unterschiede zeigten sich in den Tubulysin-endkonzentrationen und den maximalen Teilungsraten, die in Abb. 53 zusammen dargestellt sind. Die Tubulysin-endkonzentration und die maximale Teilungsrate verliefen mit steigender Sauerstoffsättigung parallel und hatten ein Maximum bei einer Sauerstoffsättigung von 30 %.



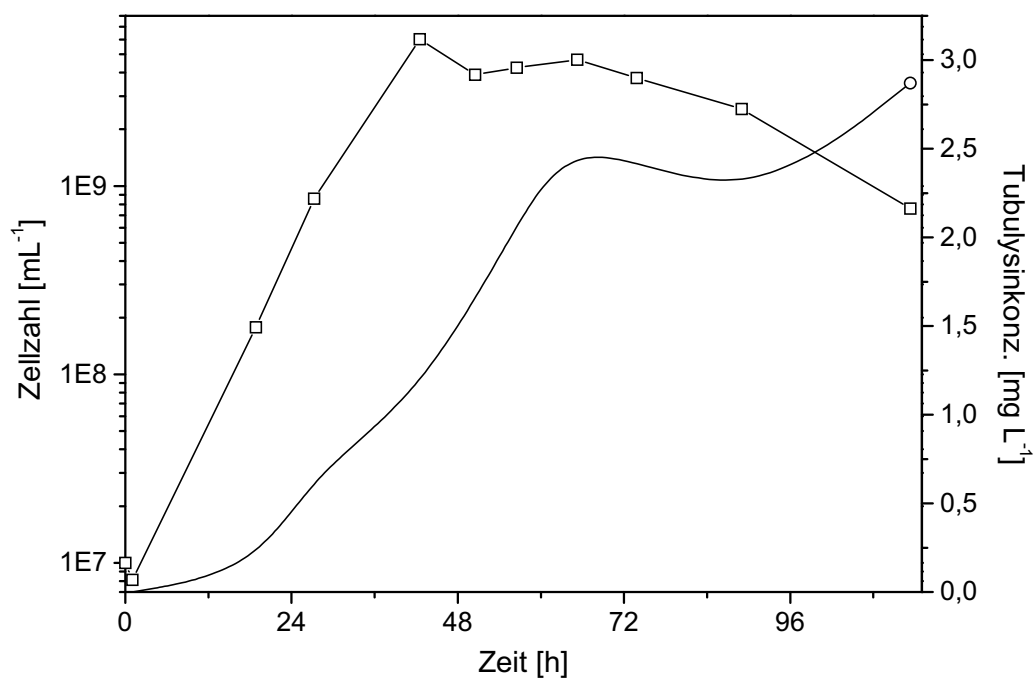
**Abb. 49: Rührerdrehzahl (—) und Sauerstoffgehalt (---) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 30 %**



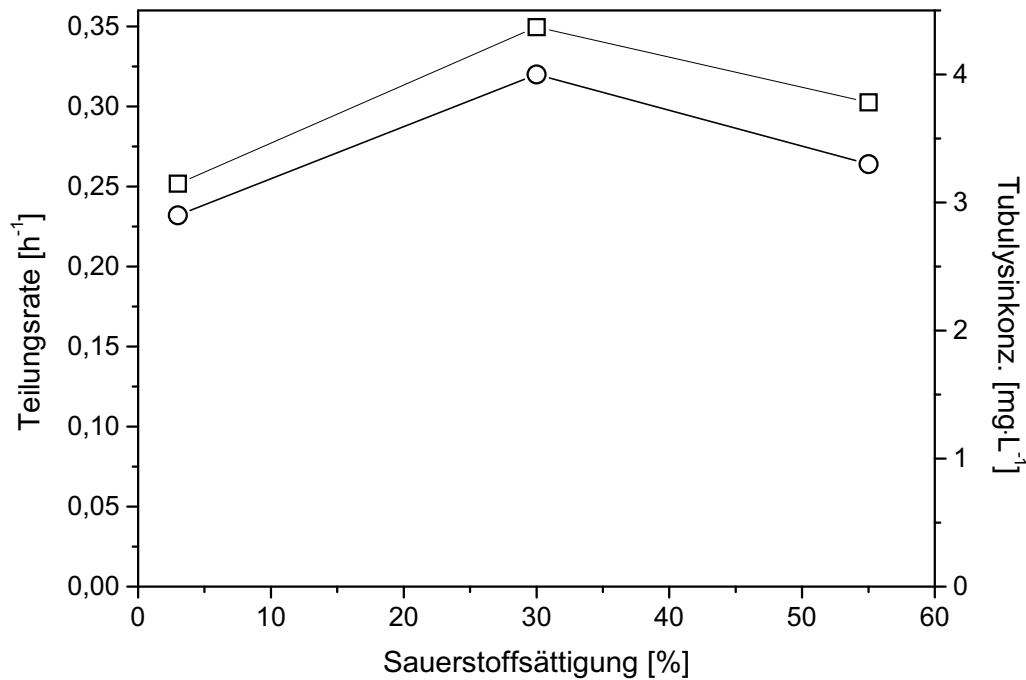
**Abb. 50: Zellzahl (□) und Tubulysinkonzentration (○) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 30 %**



**Abb. 51: Rührerdrehzahl (—) und Sauerstoffgehalt (---) im Verlauf der Fermentation**  
**Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 3 %**



**Abb. 52: Zellzahl (□) und Tubulysinkonzentration (○) im Verlauf der Fermentation**  
**Fermentation von Ar315 K3.5; Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks: 3 %**



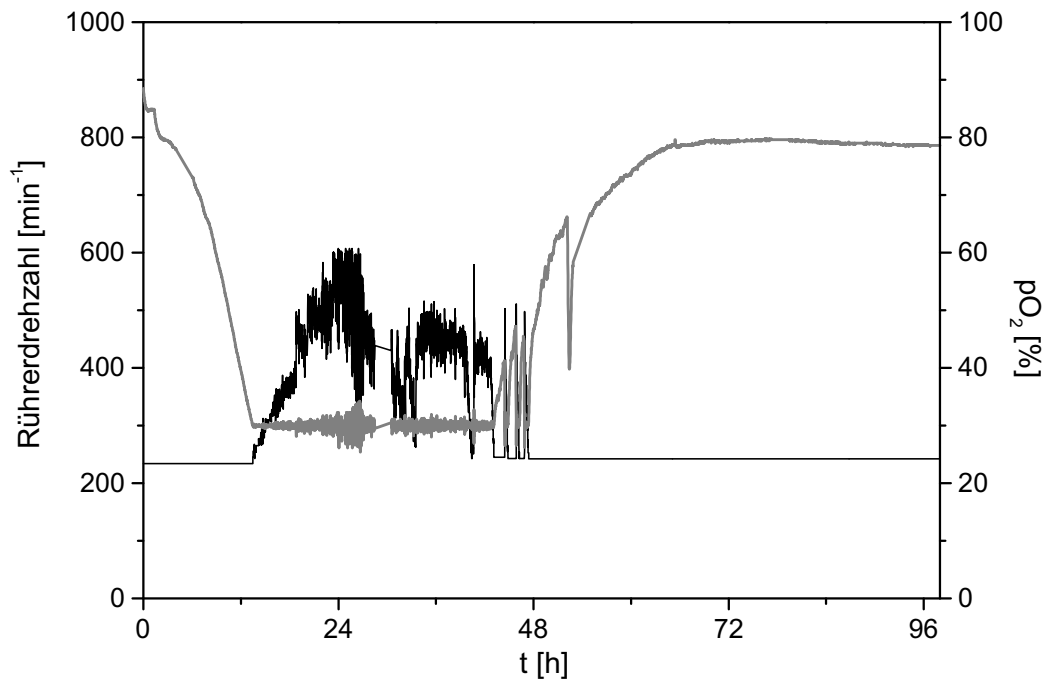
**Abb. 53: Maximale Teilungsrate und Tubulysinkonzentration in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung bei Kultivierung von *Archangium gephyra* Ar315 im Laborbioreaktor**

### 3.15.2 Zufütterungsversuche

Die im folgenden dargestellten Fermentationen zeigen Fütterungsexperimente mit den entsprechenden Kontrollen. Der Sollwert des Sauerstoffpartialdrucks wurde in allen Versuchen dieses Abschnitts auf 30 % Sättigung eingestellt. Die entsprechenden pO<sub>2</sub>-Ist-Werte und die Rührerdrehzahlen im Verlauf der Fermentationen sind in Abb. 54, Abb. 56, Abb. 58 und in Abb. 60 dargestellt.

Im ersten Fütterungsexperiment wurde ein Mediumkonzentrat aus Probion, Stärke und D-L-Pipecolinsäure zu einer Kultur von Ar315 K2.2 gefüttert. Die Fütterungspumpe startete bei Erreichen eines Sauerstoffgehalts von 30 %. Das resultierende Fütterungsprofil sowie die zudosierten Lauge- und Säurevolumina zur pH-Steuerung sind in Abb. 57 dargestellt. Die Parameter des Kontrollansatzes ohne Zufütterung des Mediumskonzentrats sind in Abb. 55 dargestellt. Der Klon K2.2 zeigte ein stark pelletiertes Wachstum, weshalb keine Bestimmungen der Zellzahl erfolgen konnte. Die Tubulysinkonzentration wurde nur zum Ende der Fermentation aus dem Gesamtvolumen bestimmt, da die Bestimmung des XAD-Volumens, also des Bezugsvolumens, durch die Zellpellets erschwert wurde. Eine Zusammenfassung aller Tubulysinendkonzentrationen dieser Versuchsreihe ist in Abb. 62 dargestellt.

Zur Regelung des pH-Wertes auf 7,4 wurde sowohl im Kontrollansatz als auch im Fütterungsversuch zunächst Lauge, dann (nach 18 h) Säure zudosiert (Abb. 55, Abb. 57). Im Verlauf der Kontrollfermentation wurden 7,4 mL 4 M KOH und 23,4 mL 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbraucht. Im Verlauf der Fermentation mit Zufütterung von Mediumskonzentrat waren es 4,1 mL 3 M KOH und 26,2 mL 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Abb. 54: Rührerdrehzahl (—) und Sauerstoffgehalt (—) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K2.2 ohne Zufütterung**

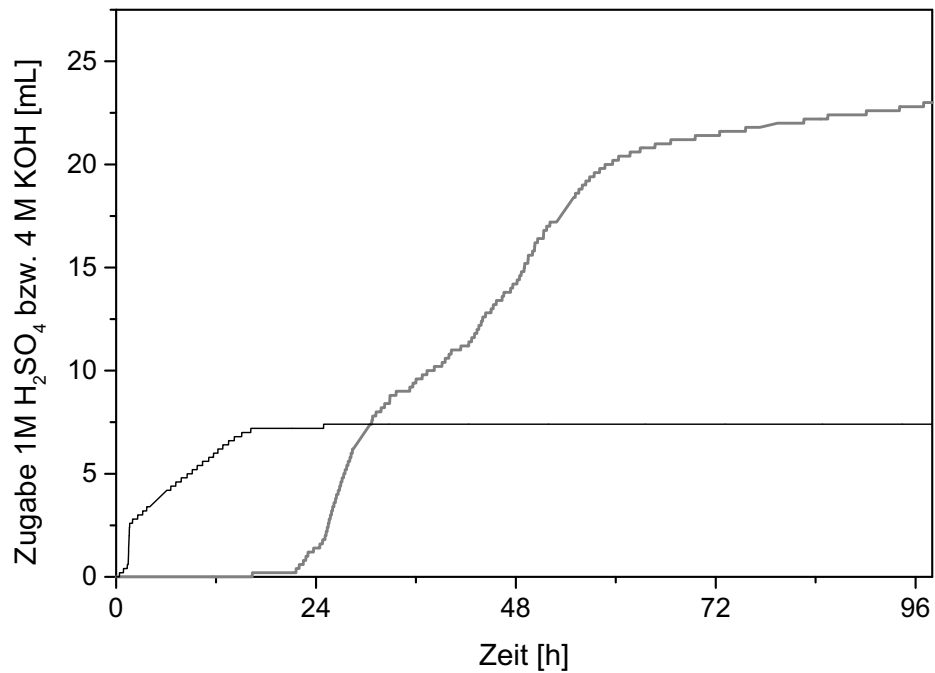


Abb. 55: Verbrauch von 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (—) und 4 M KOH (---) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K2.2 ohne Zufütterung

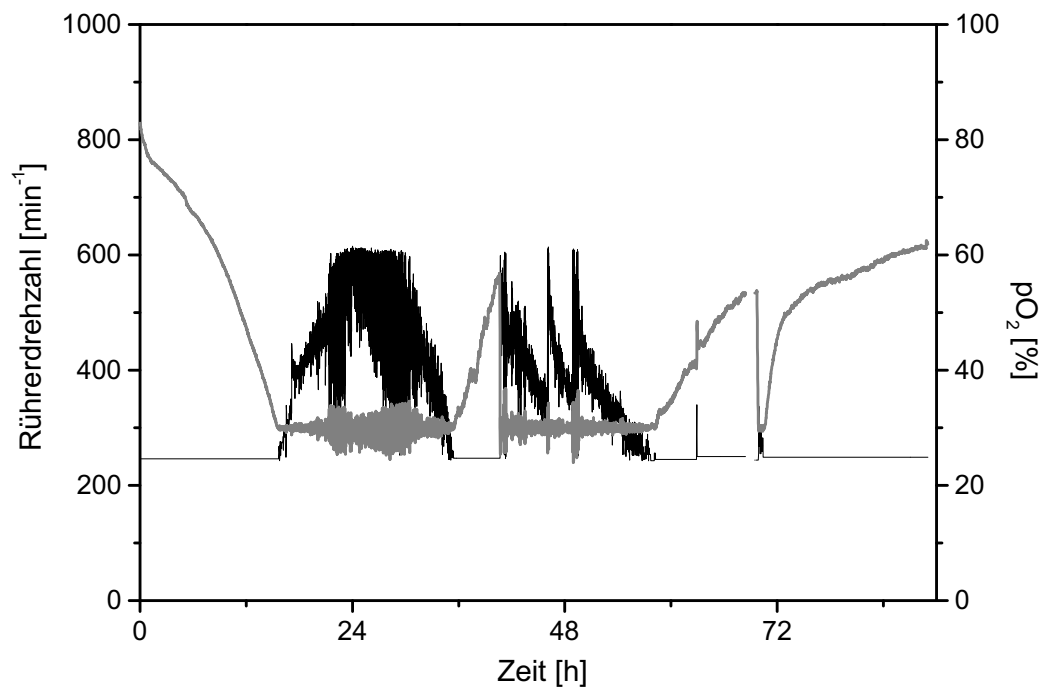
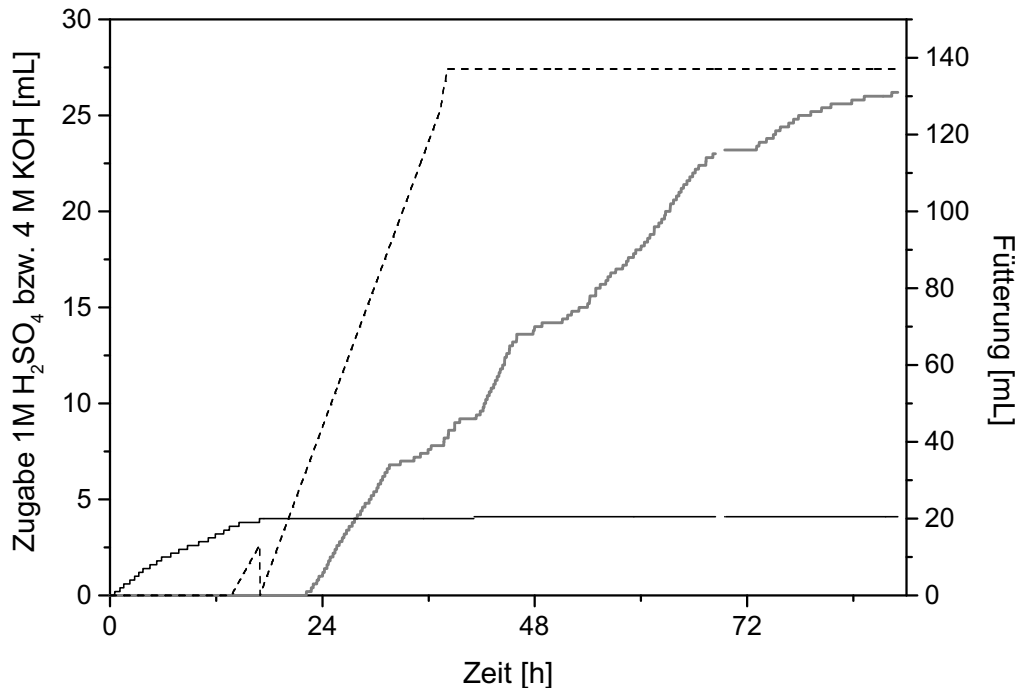


Abb. 56: Rührerdrehzahl (—) und Sauerstoffgehalt (---) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K2.2 mit Zufütterung von Stärke, Probiot und D-L-Pipecolinsäure



**Abb. 57: Verbrauch von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (—) und 4 M KOH (—) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K2.2 mit Zufütterung von Stärke, Probion und D-L-Pipecolinsäure sowie Fütterungsprofil (— —)**

Im zweiten Experiment wurde D-L-Pipecolinsäure zu einer Kultur von Ar315 K3.5 gefüttert. Auch hier startete die Fütterungspumpe bei Erreichen eines Sauerstoffgehalts von 30 %. Dadurch wurde ein Start in einer ähnlichen Wachstumsphase bei Versuch und Kontrolle sichergestellt. Das Fütterungsprofil und der Säure/Lauge-Verbrauch ist in Abb. 61 dargestellt. Den Säure/Lauge-Verbrauch im Kontrollansatz zeigt Abb. 59. Wie beim Klon K2.2 wurde auch beim Klon K3.5 zunächst Lauge, dann Säure benötigt, um den Soll-pH-Wert von 7,4 im Verlauf der Fermentation zu halten. Im Kontrollansatz wurden bis zum Ende der Fermentation 7,45 mL 1 M KOH und 31,2 mL 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verbraucht. Im Ansatz mit Zufütterung von D-L-Pipecolinsäure wurde ebenfalls 7,45 mL Lauge verbraucht. Das zudosierte Säurevolumen betrug 33,8 mL.

Auch im Verlauf der Zelldichte zeigten sich kaum Unterschiede zwischen Kontrollansatz und Fütterungsversuch, wie in Abb. 58 und Abb. 60 deutlich wird. Die maximale Zelldichte im Kontrollansatz lag bei  $2,9 \cdot 10^9$  Zellen·mL<sup>-1</sup>, im Fütterungsansatz bei  $2,2 \cdot 10^9$  Zellen·mL<sup>-1</sup>. Die Tubublysinkonzentrationen der Ansätze unterschieden sich ebenfalls kaum und sind in Abb. 62 dargestellt.



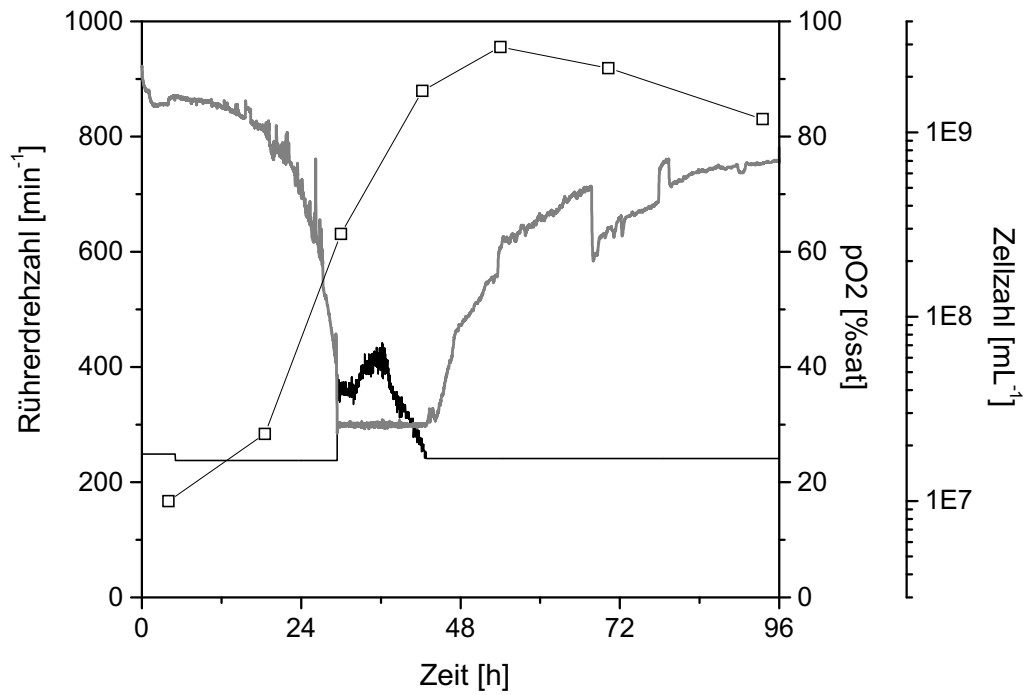


Abb. 58: Rührerdrehzahl (—), Sauerstoffgehalt (—) und Zellzahl ( $\square$ ) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 ohne Zufütterung

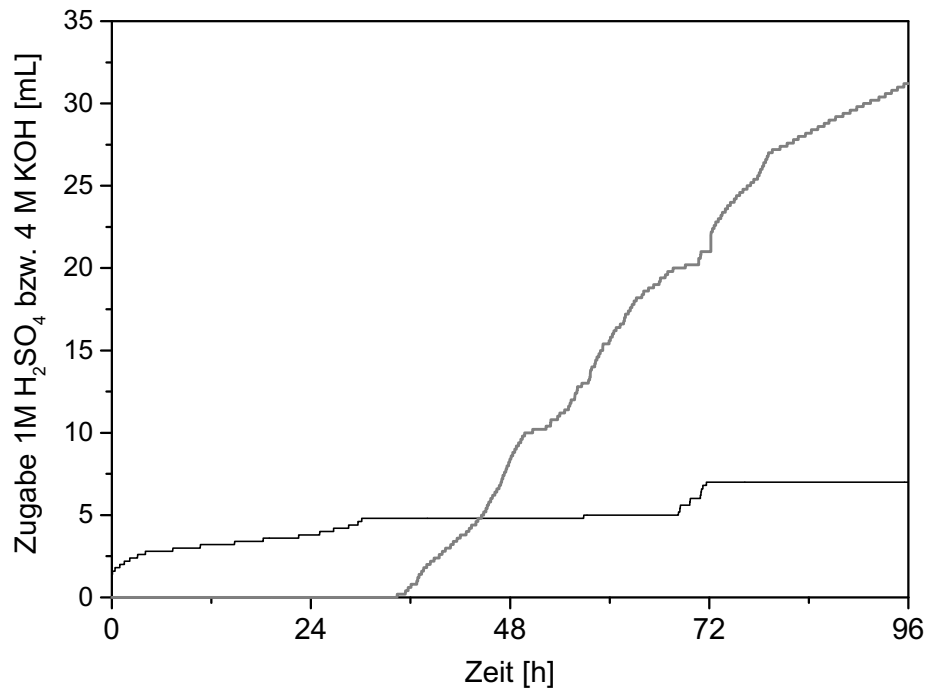


Abb. 59: Verbrauch von 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (—) und 4 M KOH (—) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 ohne Zufütterung

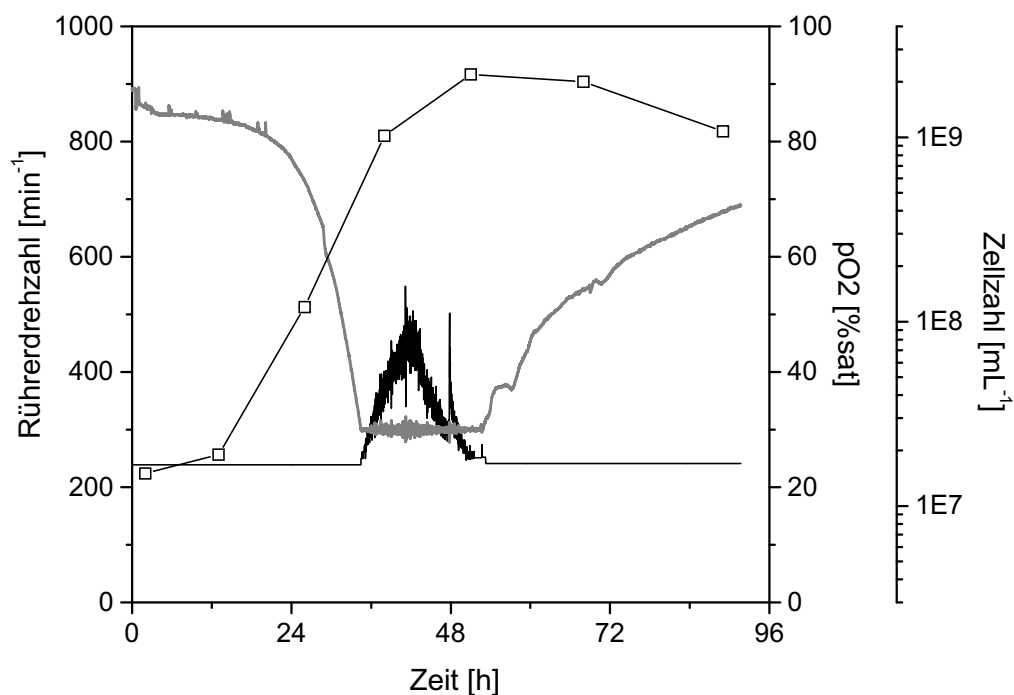


Abb. 60: Rührerdrehzahl (—), Sauerstoffgehalt (—) und Zellzahl (□) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 mit Zufütterung von D-L-Pipecolinsäure

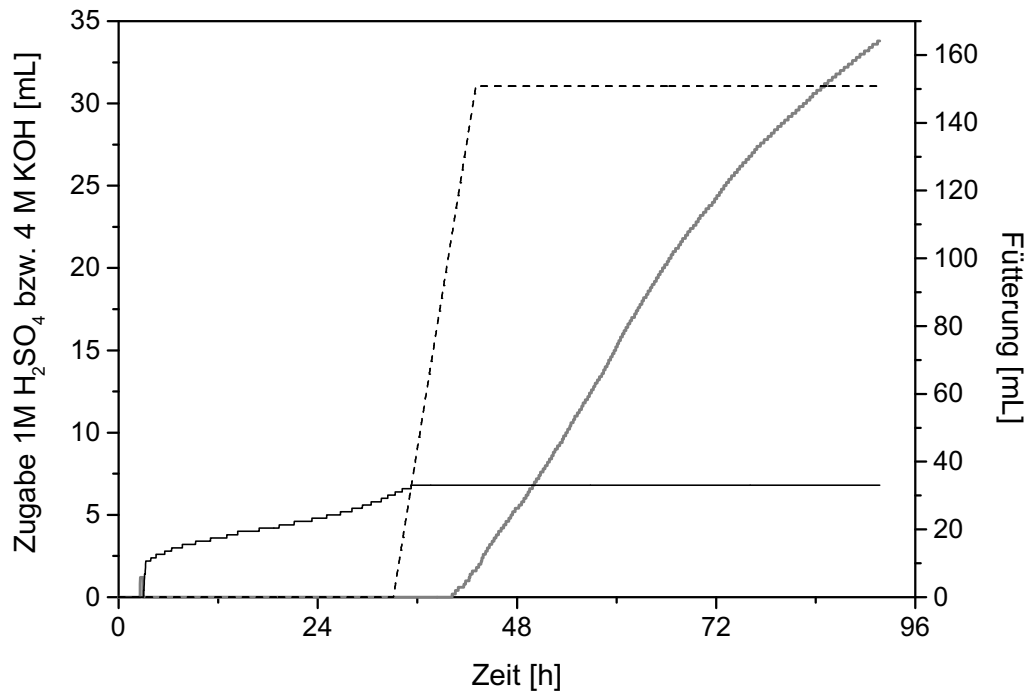
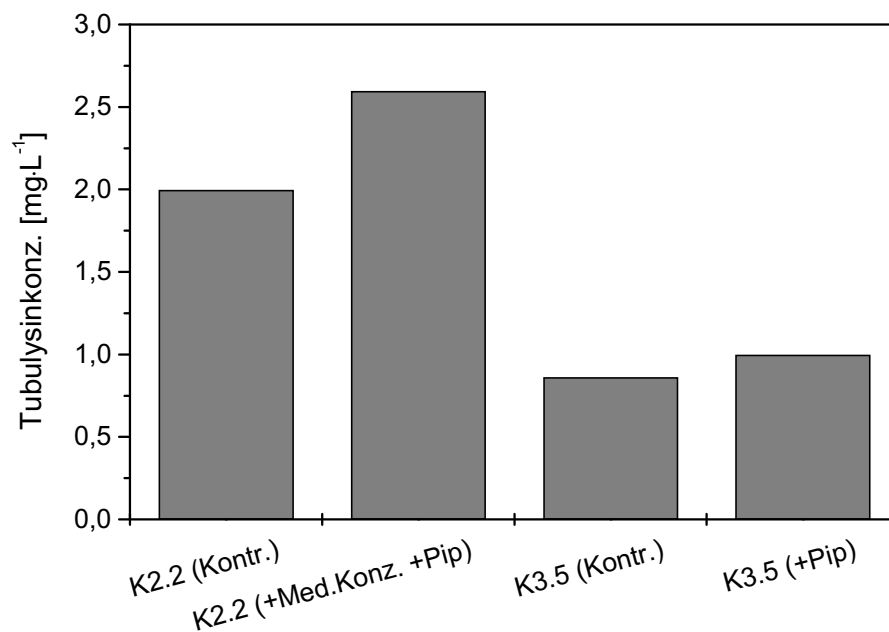


Abb. 61: Verbrauch von 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (—) und 4 M KOH (—) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.5 mit Zufütterung von D-L-Pipecolinsäure sowie Fütterungsprofil (— —)



**Abb. 62: Tubulysinkonzentrationen am Ende der Fermentation von Ar315 K2.2 bzw. Ar315 K3.5 im 4.5-L-Maßstab mit bzw. ohne Fütterung**

### 3.16 Fermentation im 10-L-Maßstab

Die Fermentation im 10-L-Maßstab verlief ohne Regelung des Sauerstoffpartialdrucks und ohne pH-Regelung. Der Verlauf dieser Parameter während der Fermentation von Ar315 K2.2 ist in Abb. 63 dargestellt. Der pH-Wert sank innerhalb der ersten 24 h leicht von 7,45 auf 7,35. Im weiteren Verlauf stieg der pH-Wert dann auf einen End-Wert von 8,0.

Der Sauerstoffpartialdruck sank innerhalb der ersten 24 h von 98 % auf 45 %. In den folgenden 24 h stieg er dann auf 80 % und im weiteren Verlauf langsam auf den End-Wert (128 h Kultivierungsdauer) von 96 %.

Abb. 64 zeigt das Zelltrockengewicht, die optische Dichte der Kultur sowie den Proteingehalt abzentrifugierter Zellen der klumpig gewachsenen Kultur von Ar315 K2.2. Im Gegensatz zum Verlauf der Sauerstoffkonzentration zeigten sich bei diesen Parametern nur geringe Änderungen im Verlauf der Fermentation. Das Trockengewicht stieg in 120 h von 1,9 g·L<sup>-1</sup> auf 3,2 g·L<sup>-1</sup>. Die optische Dichte stieg von 0,99 auf 1,94 und der Proteingehalt von 17 µg·mL<sup>-1</sup> auf 45 µg·mL<sup>-1</sup>.

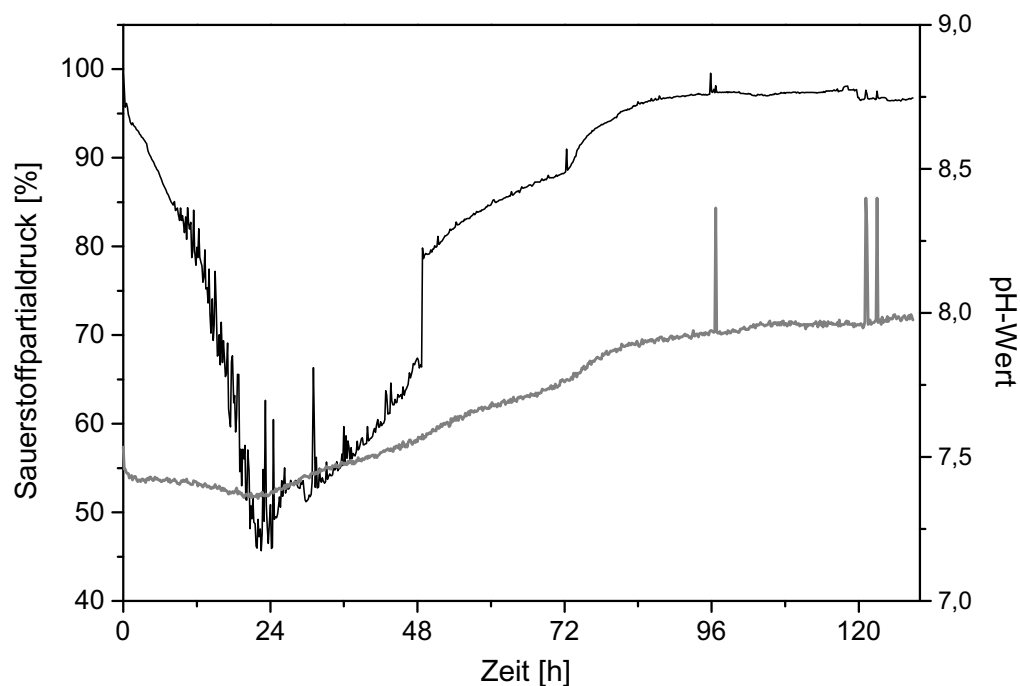


Abb. 63: Sauerstoffpartialdruck(—) und pH-Wert (---) im Verlauf der Fermentation im 15-L-Bioreaktor

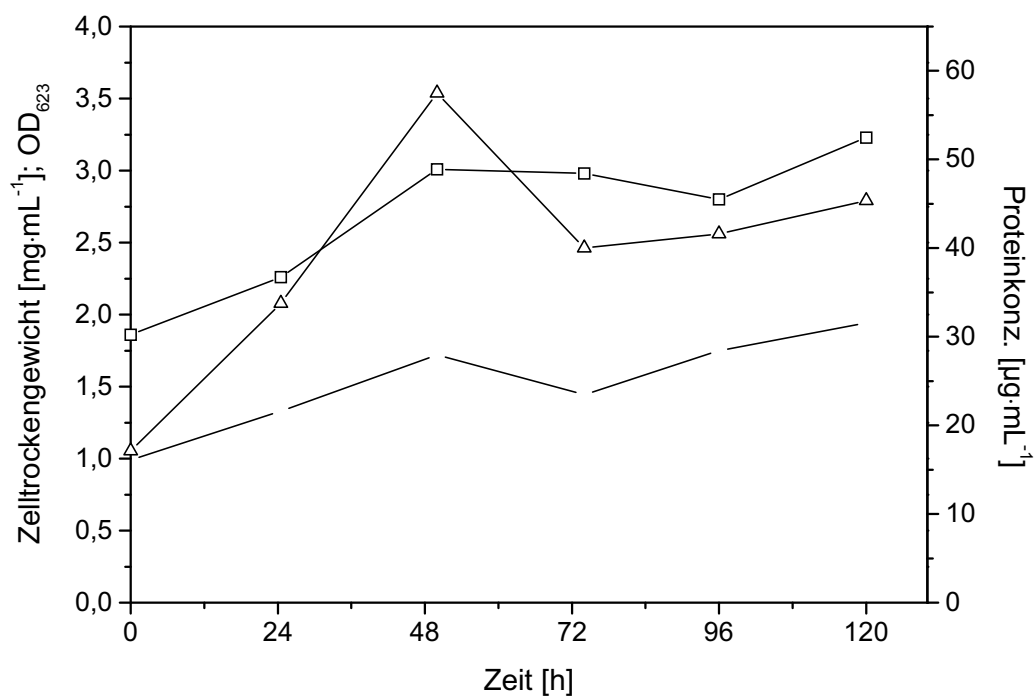
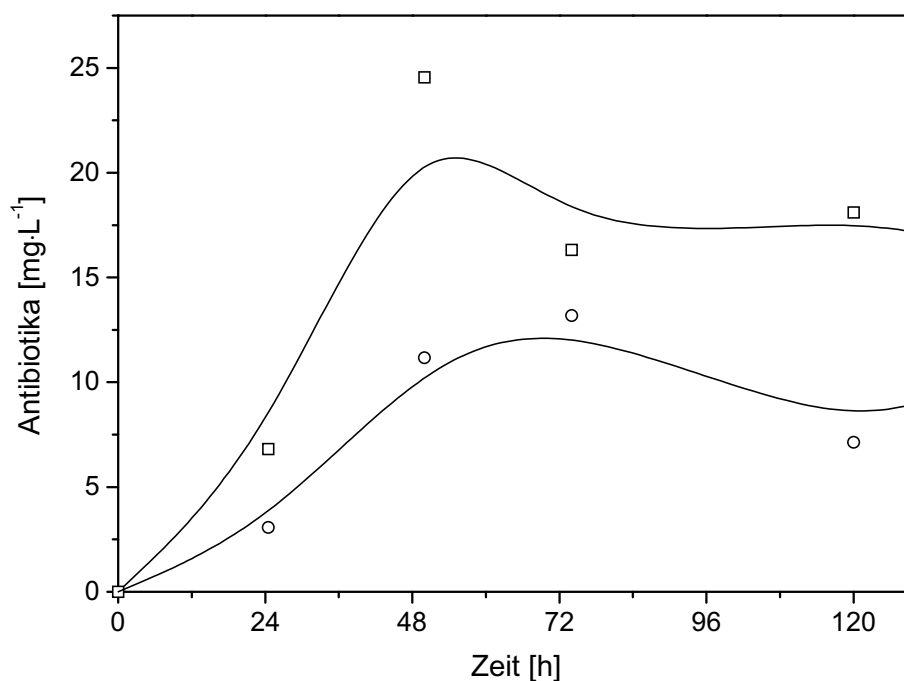


Abb. 64: Wachstumsparameter während der Fermentation von Ar315 K2.2 im 15-L-Bioreaktor; Zelltrockengewicht ( $\square$ ), optische Dichte ( $\circ$ ) und Proteinkonzentration ( $\triangle$ )

Abb. 65 zeigt die Tubulysinkonzentrationen im Verlauf der Kultivierung von Ar315 im 10-L-Maßstab. Sie stieg bis auf einen Maximalwert von  $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nach 72 h. Zum Ende der Fermentation sank die Tubulysinkonzentration dann wieder auf  $7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ab. Neben der Tubulysinkonzentration ist auch die Argyrinkonzentration dargestellt. Dabei handelt es sich um eine Verbindung, die in der HPLC nur schwer von Tubulysin getrennt werden kann (vgl. 3.1.2). Die hier dargestellten Werte wurden mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt. Die maximale Argyrinkonzentration lag nach 48 h bei  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und war damit doppelt so hoch wie die Tubulysinkonzentration.

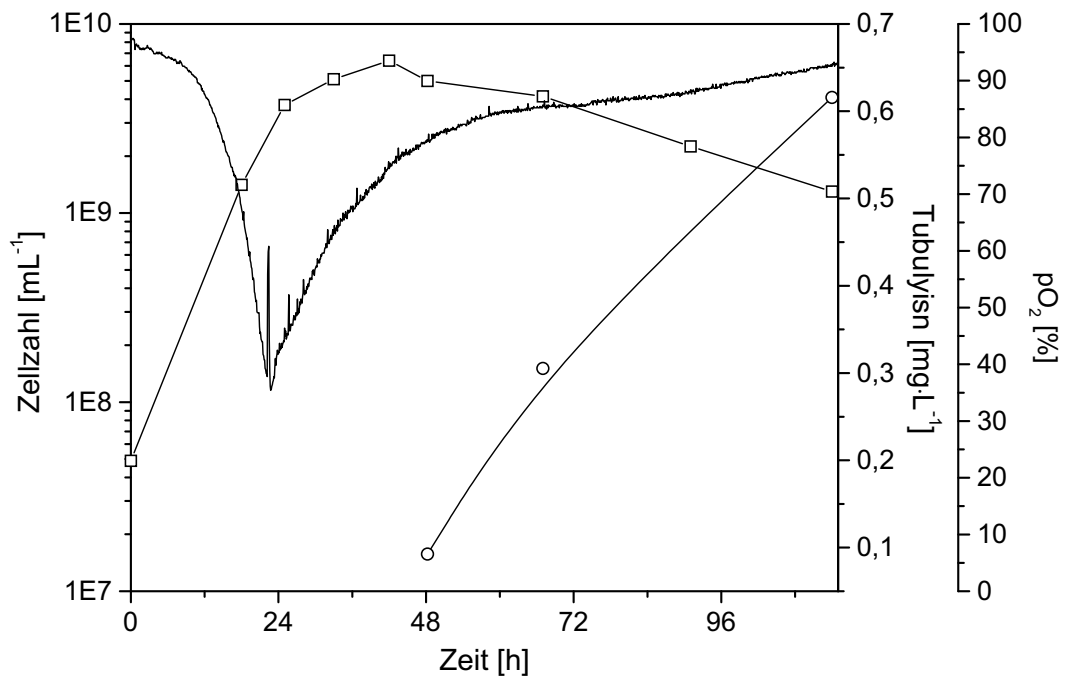


**Abb. 65: Argyrin- (□) und Tubulysinkonzentrationen (○) im Verlauf der Kultivierung von Ar315 K2.2 im 15-L-Bioreaktor**

### 3.17 Fermentation im 300-L-Maßstab

Abb. 66 zeigt den Sauerstoffpartialdruck, die Zelldichte sowie die Tubulysinkonzentration im Verlauf der Fermentation im 300-L-Bioreaktor. Der Sauerstoffpartialdruck sank innerhalb der ersten 24 h auf 35 %. In den folgenden 24 h stieg der  $p\text{O}_2$  dann stark auf 80 % an, im weiteren Verlauf stieg er langsam auf einen Wert von 95 % am Ende der Kultivierung. Die Zellzahl erreichte nach 42 h Kultivierungsdauer ein Maximum von  $6,4\cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . Im weiteren Verlauf nahm sie wieder ab. Tubulysin war erst nach 48 h nachweisbar und erreichte zum Ende der Fermentation  $0,62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Eine Kontrolluntersuchung mit Ar315 K3.8 im Schüttelkolben mit

Standardmedium (M7+) führte ebenfalls zu einer schlechten Tubulysinkonzentration von  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .



**Abb. 66: Zellzahl (□), Tubulysinkonzentration (○) und Sauerstoffpartialdruck (—) im Verlauf der Fermentation von Ar315 K3.8 im 350-L-Bioreaktor**

## 4 Diskussion

Für Untersuchungen zur Produktionsoptimierung ist eine Analytik der Zielsubstanz von großer Bedeutung. Da Tubulysin mit der im Screening-Programm verwendeten HPLC-Methode nicht detektiert werden konnte, wurde nach veränderten HPLC-Bedingungen gesucht. Das Tubulysin wurde im Diodenarraydetektor erst bei recht hohen Konzentrationen detektiert. Bei einer Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in der Standardlösung und bei einem Injektionsvolumen von  $10 \text{ } \mu\text{L}$  wurde lediglich eine Peakhöhe von 400 AU erzielt. Tendenziell wurde bei Verwendung einer Umkehr-Phase-Säule (RP) eine bessere Peakschärfe erzielt als bei Verwendung einer Normal-Phase-Säule (NP). Allerdings konnte das Tubulysin im RP-System nicht von einer im Kulturextrakt enthaltenen Nebenkompente, dem Argyrin, getrennt werden. Auch Variationen im Laufmittel, wie zum Beispiel die Zugabe von Trifluoressigsäure oder die Zugabe von Ionenpaarreagenzien (Natrium-Dodecylsulfat, Heptansulfonsäure) führten nicht zu einer Trennung von Tubulysin und Argyrin. Eine Trennung konnte durch die Verwendung einer Normalphase-Säulen erzielt werden. Tubulysin kommt in diesem System (vgl. Abb. 7) erst nach 12 Minuten von der Säule und hat eine Breite von zwei Minuten. Für eine Standardanalytik von Tubulysin waren diese Bedingungen nicht hinreichend.

Die beschriebene Methode der Dünnschichtchromatographie (vgl. Abschnitt 2.6.2) führte zu besseren Ergebnissen. Die Tubulysinflecken nach Auftrennung von Kulturextrakten zeigten sowohl das gleiche Spektrum (vgl. Abb. 5) als auch die gleiche biologische Wirkung auf tierische Zellkulturen wie die Standardsubstanz. Die DC-Methode wurde auch aufgrund des hinreichend hohen Regressionskoeffizienten ( $R = 0,9926$ , vgl. 3.1.1) der Ausgleichsgeraden von Flächen einer Probe, die in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen wurde, als Standardanalysemethode für die folgenden Versuch ausgewählt.

Der Cytotoxizitätstest hatte im Vergleich zur DC-Methode Vor- und Nachteile. Erfahrungsgemäß können nur Tubulysinkonzentrationen, die sich um den Faktor 2-3 unterscheiden im Cytotoxizitätstest determiniert werden. Im Gegensatz zur Genauigkeit zeigte der Zelltest aber eine sehr hohe Empfindlichkeit. Während die kleinste detektierbare Konzentration in der DC-Analytik bei  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  lag (bei einer maximalen Auftragemenge von  $50 \text{ } \mu\text{L}$ /Fleck nach 100facher Konzentration der XAD-Eluate lag die Nachweisgrenze entsprechend bei  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), konnten im Zelltest aufgrund der hohen Toxizität von Tubulysin bereits

Konzentrationen von  $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  nachgewiesen werden. Der Cytotoxizitätstest eignete sich gut zur Ermittlung der Produktionsleistung von verschiedenen Klonen. Zum einen konnten viele Proben parallel bestimmt werden, und zum anderen reichte die Empfindlichkeit aus, um die Konzentration in ausgestochenen Agarzylindern ohne vorherige Aufkonzentrierung zu bestimmen.

Nach einem kurzen Test der Produktionsleistung der tubulysinproduzierenden Stämme der Stammsammlung der Abteilung Naturstoffbiologie an der GBF stand *Archangium gephyra* Ar315 als Kandidat für weitere Experimente fest (vgl. Abb. 8). Um eine Stammoptimierung in Hinblick auf die Tubulysinproduktion durchzuführen, wurde der klumpig wachsende Wildstamm in homogenes Wachstum überführt (vgl. 3.3) und ein Plattierungsmedium zur Erzeugung von Einzelklonen entwickelt (vgl. 3.6). Häufig führt schon allein die Selektion von Klonen aus dem Ausgangsstamm zu besser produzierenden Stämmen. Als Beispiel sei hier die Steigerung der Penicillinproduktion durch die Klonierung von *Penicillium chrysogenum* von  $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $1,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  genannt [22, 28]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch die Klonierung von *Archangium gephyra* Ar315 eine beachtliche Produktionssteigerung von  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  erzielt werden (vgl. Abb. 15). Ein Problem stellte allerdings die Stammstabilität dar. Kein erzeugter Klon behielt mit den gewählten Konservierungsmethoden über die Zeit seine Produktionsleistung. Auch erneute Versuche zur Erhaltungsselektion konnten die Produktionsleistung nicht stabilisieren. Besonders deutlich wird der Leistungsverlust am Klon Ar315 3.8. Dieser Klon produzierte direkt nach seiner Isolierung  $7,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (vgl. Abb. 15), etwa 18 Monate später produzierte er im Rahmen der Kontrolluntersuchungen zur Fermentation im 300-L-Bioreaktor nur  $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (vgl. 3.17). Eine Beurteilung der Effekte verschiedener Faktoren auf die Produktion von Tubulysin mußte daher im Vergleich mit Kontrollen erfolgen, die im gleichen Zeitraum/Experiment erfolgten.

Mit Hilfe klassischer Mutations- und Selektionsprogramme können Produktionsstämme mit wesentlich besseren Ausbeuten erzielt werden. Mit großem Aufwand wurden schon in frühen Jahren der Antibiotikaproduktion Stammoptimierungsprogramme durchgeführt. So wurde zum Beispiel in den Jahren von 1945 bis 1955 die Streptomycinproduktivität um den Faktor 100 erhöht. Im Falle des Penicillins wurde die Produktivität in den Jahren von 1943 bis 1955 um den Faktor 400 gesteigert [2]. Obwohl die Mutationshäufigkeit sich durch die Verwendung mutagener Agenzien im Vergleich zu Spontanmutationen von  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  auf  $10^{-5}$ - $10^{-1}$  steigern läßt, bleibt der Erfolg dieser Methode auch vom Zufall abhängig. Die



Wahrscheinlichkeit, unter den erzeugten Mutanten Überproduzenten zu finden, steigt mit der Mutantenanzahl. Im Falle des Tubulysins konnten durch die UV-Bestrahlung keine Mutanten mit erhöhter Syntheseleistung erzeugt werden (vgl. Abb. 15). Es wurde aber durch die Selektion von Klonen ein Produzent mit einem veränderten Produktspektrum gefunden (vgl. Abschnitt 3.7.3). Hierbei handelt es sich offensichtlich um einen Klon mit einer Spontanmutation. Neben den Unterschieden im Produktspektrum verschiedener Klone können auch unterschiedliche Produktspektren durch variierte Kultivierungsbedingungen erzeugt werden. Eine Möglichkeit, die Umgebungsbedingungen der Myxobakterien stark zu verändern, ist die Methode der Immobilisierung. Dazu wurden homogen wachsende Kulturen von *Archangium gephyra* Ar315 in Alginat eingehüllt und kultiviert. Tatsächlich zeigten sich im Gegensatz zu freien Zellen deutliche Unterschiede im Produktspektrum (vgl. Abb. 17). In Myxobakterien werden häufig mehr Gene für Polyketidsynthasen oder Peptidsynthetasen (nicht-ribosomaler Typ) gefunden als entsprechend produzierte Substanzen [7, 8]. Neben Medienvariationen könnte die Immobilisierung der Zellen eine Möglichkeit bieten, das Sekundärstoffpotential der Myxobakterien besser auszuschöpfen. Die Veränderung des Produktspektrums drückte sich auch in einer verminderten Produktion von Tubulysin A aus. Im Gegensatz dazu konnte im Falle der Sorangicinproduktion durch die Alginateinhüllung die volumetrische Produktivität erhöht werden [6].

Für eine Tubulysinproduktion mit *Archangium gephyra* war der Zusatz des Adsorberharzes XAD-16 im Medium förderlich. Dieses wird an den Tubulysinkonzentrationen deutlich, die mit bzw. ohne XAD erzielt wurden (vgl. Abb. 12). Tubulysin und andere lipophile Stoffe wurden durch vorhandenes XAD kontinuierlich aus der Kulturbrühe extrahiert, was an der kaum nachweisbaren Tubulysinkonzentration im Kulturüberstand gezeigt wurde. Vergleicht man allerdings die Tubulysinkonzentration im XAD-Extrakt mit der Konzentration im Kulturüberstand, die ohne das Adsorberharz erzielt wurde, erkennt man eine enorme Produktionssteigerung um den Faktor 13 unter dem Einfluß von XAD. Durch die nahezu quantitative Bindung der produzierten Sekundärstoffe an das Harz werden die Stoffe aus dem Diffusionsgleichgewicht entfernt, was vermutlich den Austritt des Tubulysins aus den Zellen erleichtert. Einer möglichen Endprodukthemmung kann auf diese Weise entgegnet werden. Eine weitere Hypothese für den Produktionsunterschied mit und ohne XAD ist, daß ein Abbau des Tubulysins stattfindet, wenn es frei in der Kulturbrühe und nicht am Adsorberharz gebunden vorliegt.

Die Produktionskinetik von Tubulysin im Verlauf des Wachstums von *Archangium gephyra* war bisher nicht bekannt. Sowohl Fermentationen in Schüttelkolben als auch Fermentationen im Bioreaktor zeigten, daß es sich beim Tubulysin um einen Sekundärstoff nach der Definition von Bu'Lock handelt [12]. In den Fermentationen, in denen mit homogen wachsenden Klonen von *Archangium gephyra* gearbeitet wurde, war deutlich eine Trennung von Wachstums- und Produktionsphase zu erkennen (vgl. Abschnitte 3.4, 3.15, 3.17). Während zu Beginn der Trophophase nur geringe Mengen an Tubulysin im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnten, gab es zum Ende der Wachstumsphase einen deutlichen Sprung in der Tubulysinproduktion. Dieses Produktionsverhalten ist für viele Antibiotika durchaus üblich, wie das klassische Beispiel der Penicillin-Fermentation zeigt. Im Bereich der myxobakteriellen Antibiotika gibt es sowohl Beispiele für eine wachstumsgekoppelte Produktion als auch für eine getrennte Tropho- und Idiophase. So wird die cytotoxische Substanz Epothilon aus *Sorangium cellulosum* schon während der logarithmischen Wachstumsphase produziert [24], während der antifungische Wirkstoff Soraphen aus *Sorangium cellulosum* erst zu Beginn der stationären Phase in der Kulturbrühe nachweisbar ist [11]. Die Produktion von Gephyronsäure, die wie das Tubulysin durch *Archangium gephyra* produziert wird, erfolgt wachstumsgekoppelt [71].

Die Phosphatkonzentration hat bei der Produktion vieler Antibiotika einen starken Einfluß auf die Biosynthese. Während das Wachstum durch die Phosphatzugabe häufig gesteigert wird, wird die Sekundärstoffproduktion oft gehemmt. Bei Phosphatkonzentrationen von mehr als  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  wird die Tylosinproduktion durch *Streptomyces* gehemmt [58]. Bei der Produktion von Sorangicin oder Soraphen durch *Sorangium cellulosum* lagen die optimalen Phosphatkonzentration bei 0,23 bzw. 0,26  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  [6, 11]. Für die Tubulysinproduktion konnte mit 0,2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  eine ähnlich niedrige Phosphatkonzentration als optimal ermittelt werden (vgl. Abschnitt 3.9.1). Im Gegensatz zum Testmedium wurde dem Produktionsmedium 0,1 % Hefeextrakt zugesetzt. Aus diesem Grund lag die Phosphatkonzentration ohne weiteren Zusatz bereits im optimalen Bereich von 0,2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Durch die Zugabe von Spurenelementen konnte keine Erhöhung der Tubulysinkonzentration erzielt werden. Die komplexen Substrate, wie Probion und Hefeextrakt, beeinhalteten offensichtlich die nötigen Spurenelemente in ausreichender Menge.

Bei der chemischen Struktur des Tubulysins handelt es sich um ein Peptid, welches wahrscheinlich nichtribosomal synthetisiert wird. Zur Vorbereitung von Aminosäurezufüt-

terungsexperimenten sollte überprüft werden, ob verschiedene Aminosäuren in die Tubulysinstruktur eingebaut werden. Für L-Tyrosin konnte der Einbau nachgewiesen werden. Am rechten Teil des Moleküls ist ein Tyrosinderivat zu finden. Nach einer vorherigen Modifikation des L-Tyrosins wäre also ein Einbau am rechten Ende des Moleküls durchaus denkbar. Nach dem nachgewiesenen Einbau von L-Tyrosin stellte sich die Frage, ob durch das Verfüttern einer anderen Aminosäure ein Tubulysinderivat durch Biokonversion erzeugt werden könnte. Dem natürlichen Tubulysinderivat Tubulysin D fehlt eine Hydroxylgruppe am aromatischen Ring (vgl. Abb. 1). Durch die Zufütterung von L-Phenylalanin anstelle von L-Tyrosin sollte dieses Derivat, welches normalerweise von *Angiococcus disciformis* gebildet wird, durch *Archangium gephyra* Ar315 produziert werden. Ein Einbau von L-Phenylalanin in Tubulysin konnte aber nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise wird Tubulysin D durch ein anderes Enzymsystem gebildet als Tubulysin A. Entweder liegt dieses Enzymsystem in *Archangium gephyra* Ar315 nicht vor, oder es war unter den gegebenen Umgebungsbedingungen in Ar315 nicht aktiv. Die Kohlenstoffatome 10 und 11 in der Tubulysin-Struktur (vgl. Abb. 1) stammen aus Acetat. Der Thiazolring zwischen Pos. 6 und Pos. 11 könnte daher durch Ringschluß aus L-Cystein stammen. Für L-Cystein konnte aber kein Einbau nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, daß das benötigte L-Cystein nicht oder nur schlecht in die Zellen aufgenommen wird. In diesem Fall könnte das L-Cystein durch eine reverse Transsulfurierungsreaktion aus Methionin gebildet werden, wie es zum Beispiel im Falle der L-Cystein-Biosynthese der Cephalosporinbildner *Acremonium chrysogenum* oder *Cephalosporium acremonium* bekannt ist [5, 19, 20]. Da das Methyl-C-Atom in der N-Methyl-piperidin-Carbonsäure am linken Ende des Tubulysins aus Methionin stammt, könnte L-Pipecolinsäure eine Vorstufe in der Tubulysinsynthese sein. L-Pipecolinsäure findet man in vielen Mikroorganismen als Zwischenprodukt im L-Lysinstoffwechsel. Beispiele hierfür sind die L-Lysinbiosynthese in *Rhodotorula glutinis* [49] und in *Aspergillus nidulans* [3]. In der Biosynthese von Rapamycin aus *Streptomyces hygroscopicus* ist die aus L-Lysin gebildete freie L-Pipecolinsäure eine unmittelbare Vorstufe [61]. Gleiches gilt für die Biosynthese von Slaframin und Swainsonin aus *Rhizoctonia leguminicola* [79, 80]. Ein Einbau von L-Pipecolinsäure in Tubulysin konnte hier nicht untersucht werden, da keine markierte L-Pipecolinsäure zur Verfügung stand. Aber der nachgewiesene Einbau von L-Lysin ist durchaus über den Weg der L-Pipecolinsäure denkbar.

Die Zugabe von L-Lysin führte bei der Rapamycinproduktion zu einer deutlichen Erhöhung der volumetrischen Produktivität [15]. Ein interessanter Effekt zeigte sich bei der

schrittweisen Erhöhung der L-Lysinkonzentration. Bei einer L-Lysinkonzentration von  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  kam es zunächst zu einer Erhöhung um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer weiteren Steigerung der L-Lysinkonzentration fiel die Rapamycinkonzentration zunächst ab. Bei  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  stieg die Konzentration des Antibiotikums dann wieder stark an (Faktor 2,5 im Vergleich zur Kontrolle). Während durch die L-Lysinzugabe die Tubulysinproduktivität nicht gesteigert werden konnte, gelang dies aber durch die direkte Zugabe von freier D-L-Pipecolinsäure. Und wie beim Rapamycin zeigten sich auch hier bei Erhöhung der Aminosäurekonzentration zwei Maximalwerte in der Antibiotikumskonzentration (vgl. Abb. 33). Im untersuchten D-L-Pipecolinsäurekonzentrationsbereich wurde das Wachstum von *Archangium gephyra* nicht eingeschränkt. Bei der Zugabe von L-Lysin hingegen zeigte sich schon bei einer Konzentration von  $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  eine Wachstumshemmung. Der Grund für die niedrigen volumetrischen Tubulysinproduktivitäten liegt also offensichtlich im geringen Wachstum bei L-Lysinzugabe. Eine mögliche Produktionssteigerung durch L-Lysinzugabe, wie im Falle des Rapamycins, wäre denkbar, wenn man lysinresistente Klone von *Archangium gephyra* isolieren würde.

Um einen Überblick zu erhalten, welche Medienbestandteile sich für die Produktion von Tubulysin eignen, wurde die Methode des Griechisch-Lateinischen Quadrats gewählt. Im Gegensatz zur „Ein-Faktor-Pro-Experiment-Methode“ ist es mit dieser Methode möglich, viele unterschiedliche Medienkomponenten in relativ wenigen Medien zu testen [4, 26]. Dabei werden die verschiedenen Komponenten nur in einer Konzentrationsstufe getestet, um die prinzipielle Eignung im Produktionsmedium zu testen. Ein mögliches Problem bei dieser Methode ist, daß nicht alle Komponenten in verschiedenen Experimenten aufeinandertreffen. So könnte ein Komponente sich erst dann als geeignet herausstellen, wenn sie mit einem bestimmten Nebenbestandteil verwendet wird. Das Problem wird auch in den hier durchgeführten Experimenten deutlich. Unter den gewählten Mediumsumgebungen im Griechisch-Lateinischem Quadrat erzielt ein pH-Wert von 7,0 eine wesentlich bessere Güte als ein pH-Wert von 7,5 (vgl. Abb. 25). In der Standardmediumsumgebung führt allerdings ein pH-Wert von 7,4 zu den besten Ergebnissen (vgl. Abb. 21).

Die Hauptidee, die aus den Experimenten mit dem Griechisch-Lateinischem Quadrat gewonnen wurden, ist die Eignung von Procion für die Produktion von Tubulysin (vgl. Abschnitt 3.9.4). Das Einzellerprotein Procion aus *Methylomonas clara* zeigte sich für das Wachstum von Myxobakterien und für die Produktion von Antibiotika schon eher als

geeigneter technischer Medienbestandteil. Gerth et al. zeigten, daß Probion ein hervorragendes Substrat für alle nicht-cellulolytischen Myxobakterien ist [25]. Über das Wachstum von Myxobakterien auf bakteriellen Zellen ist vor allem in Hinblick auf die Isolierung und Anreicherung berichtet worden [64]. Das Probion ist nun ein leicht und in großen Mengen standardisiert herzustellendes Substrat auf der Basis von bakteriellen Zellen. Da Probion aber nicht mehr produziert wird, ist es in Zukunft erforderlich, ein ähnlich geeignetes technisches Substrat für die Sekundärstoffproduktion aus Myxobakterien zu finden.

Ähnliche Ansätze, wie in der Methode des Griechisch-Lateinischen Quadrats, werden auch in anderen Methoden zur Medienoptimierung verfolgt. Hier seien zum Beispiel die Rosenbrock-Methode [76], die Box-Wilson-Methode [10] und die Methode der orthogonalen Feldanordnung [73] genannt. Ein anderes Konzept zur Medienoptimierung liefert die Methode des Genetischen Algorithmus, die hier für die Optimierung der Konzentrationsverhältnisse eines Aminosäurecocktails angewendet wurde [23, 46, 77, 78]. Der Ablauf der Methode ist in im Material- und Methodenteil näher erläutert (vgl. Abschnitt 2.8.4). Bei biotechnologischen Optimierungsproblemen bietet der Genetische Algorithmus (GA) einige Vorteile. Die Methoden zur statistischen Versuchsplanung, wie sie weiter oben in diesem Absatz aufgelistet wurden, gehen häufig von linearen Modellen aus. Der Parameterraum wird nach vorher bestimmten deterministischen Regeln untersucht. Durch die Elemente der Wahrscheinlichkeitsrechnung im GA wird hier viel variabler und nichtlinear nach den Optima der Parameter gesucht. Ein weiterer Vorteil ist, daß sich auch Medien, die sich als ungünstig erwiesen haben, an der Suche nach dem Optimum beteiligen können. Diese Medien werden sich mit einer geringen Wahrscheinlichkeit an der nächste Iterationsstufe beteiligen. Obwohl sich eine bestimmte Parameterkombination als ungünstig erwiesen hat, könnte sich durch die Veränderung nur eines Parameters diese Kombination als sehr gut herausstellen. Bei der Durchsuchung des Paramterraumes kann so vermieden werden, daß die Optimierung in einem Submaximum endet. Die Zufallselemente im GA könnten sich aber auch als Problem herausstellen, sofern in der ersten Mediengeneration nicht Medien gefunden werden, die eine Nähe zum Optimum haben. Da sich hauptsächlich die guten Medien der Muttergeneration in der Tochtergeneration wiederfinden, könnte der suboptimale Bereich erst nach einigen Generationen verlassen werden, was eine starke Erhöhung der Versuchszahl zur Folge hätte. Aufgrund des iterativen Charakters ist der GA unempfindlich gegen Meßrauschen. Medien, die aufgrund einer leichten Meßungenauigkeit als etwas ungünstiger getestet werden, werden

sich sehr wahrscheinlich trotzdem an der nächsten Generation beteiligen. Bei der Suche nach optimalen Konzentrationsverhältnissen eines Aminosäurecocktails für das Tubulysin-Produktionsmedium hat sich der GA als günstige Methode herausgestellt. Bereits nach der vierten Generation wurde unter den gewählten Bedingungen eine Verdopplung der Tubulysinkonzentration erzielt. Bemerkenswert ist, daß sich im Verlauf der Optimierung zwei Pipecolinsäurekonzentrationen als gut herausgestellt haben. Medien, die um  $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  oder um  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  D-L-Pipecolinsäure enthielten, zeigten hohe Tubulysinkonzentrationen (vgl. Tabelle 12). Auch bei der Untersuchung der D-L-Pipecolinsäure als einzigem variablen Parameter zeigte sich ein Doppelmaximum (vgl. Abb. 33).

Zusammen mit anderen Gattungen der Unterordnung der Cystobacterineae zeichnet sich die Gattung *Archangium* neben der bakteriolytischen Eigenschaft auch durch die Verwertung von Kohlenhydraten aus. Wegen der häufig beobachteten Kohlenhydratrepressionen bei der Sekundärstoffproduktion wurde dieser Komplex näher untersucht. Auffällig war, daß *Archangium gephyra* im Verlauf der Kultivierung etwa  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Stärke, aber nur etwa  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Glukose verbrauchte. Offensichtlich nimmt die Stärke ab, weil von den Zellen ein Verdauungsprodukt der Stärke aufgenommen wird. Während sich auch beim Disaccharid Maltose keine deutliche Konzentrationsabnahme zeigte, wurde in Kulturen von *Archangium gephyra*  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  des Trisaccharids Maltotriose verbraucht (vgl. Abschnitt 3.13). Im Gegensatz zum Kontrollansatz oder in Ansätzen mit Glukose oder Maltose konnte durch die Zugabe von Maltotriose oder Stärke das Wachstum stimuliert werden. Während sich die maximalen Wachstumsraten in allen Fälle kaum unterschieden, zeigten Kulturen mit Stärke bzw. Maltotriose eine verlängerte stationäre Phase und eine doppelt so hohe Zelldichte zum Ende der Kultivierung. Das gleiche Verhalten in Bezug auf den Kohlenhydratverbrauch konnte bei dem Myxobakterium *Coralloccoccus coralloides* beobachtet werden [40]. Die beobachteten höheren Tubulysinkonzentrationen in den Ansätzen mit Stärke bzw. Maltotriose liegen also offensichtlich an den höheren Zelldichten, vor allem in der stationären Phase, also der Produktionsphase. Dieses wird durch einen Vergleich von spezifischer und volumetrischer Produktivität bestätigt. Zum Ende der Kultivierung liegt die volumetrische Produktivität im Kontrollansatz bei  $9,11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  und im Ansatz mit Maltotriose bei  $12,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Die spezifischen Produktivitäten hingegen liegen bei  $0,55$  bzw. bei  $0,33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mL}\cdot(10^9 \text{ Zellen})^{-1}$  in gleicher Reihenfolge. Pro  $10^9$  Zellen wird also im Kontrollansatz ohne Stärke oder Maltotriose deutliche mehr Tubulysin produziert als im Ansatz mit Maltotriose, was auf eine Kohlenhydratrepression hindeutet. Entscheidender für den Prozess ist allerdings die

volumetrische Produktivität, die bei gleicher Produktionsdauer proportional zur Konzentration im Kulturextrakt ist. Durch die höhere Zellzahl ist sie in den Ansätzen mit Maltotriose bzw. Stärke höher.

Für die Untersuchung des Wachstums- und Produktionsverhaltens im Bioreaktor sollte die Stabilität des Adsorberharzes XAD-16 untersucht werden. Im Gegensatz zum Schüttelkolben war im turbulent gerührten Bioreaktor eine stärkere Belastung des Harzes zu erwarten. Durch die Ernte des XAD über ein Sieb würden sich Abriebverluste negativ auf die Ausbeute auswirken. Die Untersuchungen im Laborbioreaktor ergaben, daß der Harzabrieb unter den gewählten Bedingungen bei Drehzahlen höher als  $720 \text{ min}^{-1}$  stark zunahm (vgl. Abb. 44). Offensichtlich war bei dieser Drehzahl im Bioreaktor die Belastungsgrenze für die Harzpartikel erreicht. Für die folgenden Versuche in diesem Bioreaktor wurde die Drehzahl demzufolge auf Werte zwischen  $200 \text{ min}^{-1}$  und  $600 \text{ min}^{-1}$  eingestellt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten und einen Harzabrieb zu vermeiden. Die anderen geometrischen Verhältnisse im 300-L-Technikumsbioreaktor erforderten eine niedrigere Drehzahleinstellung, um die mechanische Belastung des Harzes gering zu halten (vgl. Abb. 45).

Die Experimente zur Untersuchung des Sauerstoffeinflusses und Zufütterungsexperimente wurden im Laborbioreaktor durchgeführt. Um über einen möglichst langen Zeitraum eine gleichmäßige Sauerstoffkonzentration zu halten, wurde der Sauerstoffgehalt bei konstanter Belüftungsrate über die Drehzahl geregelt. Die Regelungsparameter wurden zuvor empirisch an die Fermentationsbedingungen angepaßt. Neben der Zellzahl ist auch die Sauerstoffkonzentration im Medium ein Maß für das Wachstum der Bakterien. Im Falle der Sauerstoffregelung können nun Änderungen der Wachstumsphasen über den Drehzahlverlauf erkannt werden. Am Beispiel der Fermentation von Ar315 K3.5 bei einer Sauerstoffsättigung von 55 % wird dies deutlich (vgl. Abb. 47, Abb. 48). Bei Einsetzen der Regelung in der exponentiellen Wachstumsphase steigt die Rührerdrehzahl parallel zur Zellzahl stark an. In der folgenden stationären Phase und in der Absterbephase fällt auch die Rührerdrehzahl wieder ab. Im Falle der Fermentationen mit dem klumpig wachsenden Klon K2.2, bei dem keine Bestimmung der Zellzahl möglich war, kann also der Verlauf der Sauerstoffsättigung bzw. der Verlauf der Rührerdrehzahl ein Maß für den Wachstumsverlauf darstellen (vgl. Abb. 54, Abb. 56). Im Verlauf der Fermentationen zeigten sich parallel zur manuellen Antischaummittelzugabe kurzfristige Erhöhungen der Rührerdrehzahl. Dieses Phänomen läßt sich durch einen veränderten Sauerstoffübergangskoeffizienten  $K_{La}$  erklären. Durch die Zugabe einer oberflächen-

aktiven Substanz, wie Antischaummittel, wird die Erneuerung der Luftblasenoberfläche durch Vibration und Oszillation stark beeinträchtigt, was zu einer schlechteren Sauerstoffübergangsrate führt [16]. In Abb. 42 wurde gezeigt, daß die Sauerstoffübergangsrate mit steigender Drehzahl im Laborbioreaktor immer stärker ansteigt. Die Regelung kann also die absinkende Sauerstoffübergangsrate durch eine starke Erhöhung der Rührerdrehzahl ausgleichen.

Unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen im Medium führten zu unterschiedlichen Tubulysinendkonzentrationen. Die maximale Tubulysinkonzentration wurde bei einer Sauerstoffsättigung von 30 % erzielt. Auffällig ist der parallele Verlauf von maximaler Teilungsrate und maximaler Tubulysinkonzentration (vgl. Abb. 53). Obwohl Tubulysin hauptsächlich in der stationären Phase gebildet wird, scheint die Produktion mit der maximalen Wachstumsrate zu korrelieren. Dieses wäre plausibel, wenn durch das schnellere Wachstum auch eine höhere Zelldichte erzielt würde. Die Zellkonzentrationen lagen in der stationären Phase aber bei allen Fermentationen bei  $4 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$ . Die stationäre Phase dauerte in allen Fällen etwa 30 h. Bei der optimalen Sauerstoffsättigung von 30 % ist die Tubulysinkonzentration am höchsten (Steigerung um 38 % gegenüber einer Sauerstoffsättigung von 3 %), trotz gleicher Zellzahl in der stationären Phase. Kempf beobachtete eine Steigerung um 50 % bei der Produktion von Gallidermin durch *Staphylococcus gallinarum* durch Herabsetzen der Sauerstoffkonzentration, obwohl bei dieser schlechteren Sauerstoffversorgung die Biomassebildung um 65 % geringer war [47]. Die erhöhte Sekundärstoffproduktion durch Streßfaktoren (in diesem Fall eine Sauerstoffknappheit) kann für die Tubulysinproduktion durch *Archangium gephyra* nicht als Erklärung dienen. Obwohl bei einer geringen Sauerstoffsättigung von 3 % ein langsames Wachstum zu beobachten war, wurde weniger Tubulysin produziert als bei 30 % Sauerstoffsättigung.

Im Verlauf der Fermentationen im 6-L-Laborbioreaktor wurde der pH-Wert auf 7.4 geregelt. Der qualitative Verlauf des pH-Wertes ergab sich demnach aus der Zudosierung von Säure und Lauge. Während in den ersten 18 h der Fermentation Lauge verbraucht wurde, wurde im weiteren Verlauf Säure zudosiert, um den pH-Wert auf 7,4 zu halten. Bei der ungesteuerten Fermentation unter Zusatz von HEPES-Puffer zeigte sich die gleiche Tendenz. Zunächst sinkt der pH-Wert, im weiteren Verlauf steigt er an (vgl. Abb. 63). Offensichtlich gab es im Verlauf der Fermentation eine Stoffwechselumschaltung. Ein derartiges Verhalten wäre durch ein Umstellen von Kohlenhydratverbrauch auf einen Aminosäureverbrauch zu erklären.



Während durch die Veratmung von Kohlenhydraten  $\text{CO}_2$  frei wird, welches als  $\text{H}_2\text{CO}_3$  das Medium ansäuert, würde durch einen späteren Abbau von Aminosäuren Ammonium entstehen (Desaminierung), was den pH des Mediums ansteigen lassen würde. Die Versuche zum Kohlenhydratstoffwechsel zeigten, daß Stärke bzw. Maltotriose im Verlauf der gesamten Fermentation gleichmäßig verbraucht werden. Wahrscheinlich werden also zunächst Kohlenhydrate verbraucht. Später könnten dann Desaminierungsreaktionen hinzugezogen werden, um den weiteren Energiebedarf zu decken. In der Summe führt dann der Aminosäureabbau zu einem Ansteigen des pH-Wertes bzw. zu einer Zudosierung von Säure. Hier könnten genauere Untersuchungen zum Aminosäurestoffwechsel in *Archangium gephyra* hilfreich sein.

Durch die Zufütterung von konzentriertem Medium unter Zusatz von D-L-Pipecolinsäure zu einer Kultur von Ar315 K2.2 konnte eine Erhöhung der Tubulysinkonzentration erzielt werden (vgl. Abb. 62). Da der Klon K2.2 klumpig wuchs, kann das Wachstumsverhalten nur über die Änderung des Sauerstoffgehalts bzw. der Rührerdrehzahl betrachtet werden. Wie das Beispiel der Fermentation im 10-L-Maßstab zeigte, spiegelten andere Parameter, wie die Zelltrockenmasse, die optische Dichte oder die Proteinkonzentration das Wachstum nur ungenügend wieder. Die nur leichten Änderungen dieser Parameter im Verlauf der Kultivierung lassen sich wie folgt erklären: Da das technische Medium Probion enthält und damit durch die enthaltenen toten Zellen und Zellbruchstücke eine starke Trübung aufweist, liegen bereits die Anfangswerte der optischen Dichte recht hoch. Während sich im Verlauf der Kultivierung die Myxobakterien vermehren wird Probion verbraucht. In der Summe sind also nur geringe Änderungen der optischen Dichte zu erwarten. Ähnlich sieht es bei der Bestimmung des Zelltrockengewichts oder des Proteingehaltes aus. Die Zellpartikel des Probions lassen sich nicht von den zu bestimmenden Zellen trennen, was eine isolierte Bestimmung der Myxobakterien verhindert. Im Vergleich zur Kontrolle scheinen die Zellen im Versuch mit Zufütterung von Mediumkonzentrat länger aktiv zu sein. Die Zeitspanne, in der die Sauerstoffkonzentration auf 30 % Sättigung geregelt werden kann, liegt hier bei 48 h im Gegensatz zu 36 h in der Kontrolle. Die höhere Tubulysinausbeute, die durch die Zufütterung erzielt wurde (vgl. Abb. 62), könnte also an einer verlängerten stationären Phase liegen. Die Zufütterung von D-L-Pipecolinsäure ohne Mediumkonzentrat führte nur zu einer leichten Erhöhung der Tubulysinkonzentration. Die starken Effekte, die im Schüttelkolben beobachtet wurden, konnten im Bioreaktor also nicht bestätigt werden.

## 5 Zusammenfassung

- Tubulysin ist ein Wirkstoff, welcher erstmals aus *Archangium gephyra* (Myxobakterium) isoliert wurde. Das Peptid mit einer Molekülmasse von  $843 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  wirkt cytotoxisch auf Säugerzellkulturen und humane Krebszelllinien.
- Tubulysin wird durch *Archangium gephyra* Ar315 hauptsächlich in der stationären Phase produziert. Es ist eine deutliche Trennung von Wachstums- und Produktionsphase zu erkennen, was Tubulysin als Sekundärstoff nach der Definition von Bu'Lock auszeichnet.
- Nachdem *Archangium gephyra* in ein disperses Wachstum überführt wurde, konnte die Tubulysinproduktion durch Selektion von Einzelklonen von  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  erhöht werden.
- Die kontinuierliche Tubulysinextraktion im Verlauf der Kultivierung durch die Zugabe des Adsorberharzes XAD-16 führt zu einer erheblichen Produktionssteigerung um den Faktor 13.
- Die Immobilisierung von *Archangium gephyra* führt zu einem veränderten Produktspektrum
- Eine Medienoptimierung mit der Methode des Griechisch-Lateinischen Quadrats führte zum Einzellerprotein Probion als beste technische Stickstoffquelle für die Produktion von Tubulysin.
- Aminosäuren zeigten einen Einfluß auf die Produktion von Tubulysin. Für die Aminosäuren L-Tyrosin und L-Lysin konnte ein Einbau in die Tubulysinstruktur nachgewiesen werden. Die ungewöhnliche Aminosäure Pipecolinsäure führt zu einer gesteigerten Produktion. Insgesamt konnte die Tubulysinproduktion durch die Optimierung der Aminosäurezusammensetzung mit Hilfe von genetischen Algorithmen um den Faktor 2 gesteigert werden.
- Durch eine Anpassung der Regelungsparameter konnte ein eingestellter Sauerstoffsollwert über weite Strecken der Fermentation im Laborbioreaktor gehalten werden. Für die Tubulysinproduktion eignet sich eine Sauerstoffsättigung von 30 % am besten.

## 6 Literatur

1. Aharonowitz Y., Demain A.L. (1978): Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 14, 159-164.
2. Alikhanian S.I. (1962): Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. Advances in Applied Microbiology, 4, 1-50.
3. Aspen A.J., Meister A. (1962): Conversion of aminoadipic acid to L-pipecolic acid by *Aspergillus nidulans*. Biochemistry, 1, 606-612.
4. Auden J., Gruner J., Nüesch J., Knüsel F. (1967): Some statistical methods in nutrient medium optimisation. Path Microbiol, 30, 858-866.
5. Bartoshevich Y., Zaslavskaya P.L., Novak M.J., Yudina O.D. (1990): *Acremonium chrysogenum* differentiation and biosynthesis of cephalosporin. Journal of Basic Microbiology, 30, 313-320.
6. Becker K. (1990): Antibiotica-Produktion mit trägerfixierten Myxobakterien. Dissertation, Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig.
7. Beyer S. (1999): Persönliche Mitteilung. Abteilung Naturstoffbiologie, GBF.
8. Beyer S., Kunze B., Silakowski B., Müller R. (1999): Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. Biochimica et Biophysica Acta, 1445, 185-195.
9. Bollag D.M., P.A. M., Zhu J., Hesens O., Koupal L., Liesch L., Goetz M., Lazardies E., Woods C.M. (1995): Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. Cancer Research, 55, 2325-2333.
10. Box G., Hunter W. (1957): Multi-factor experimental design for exploring response surface. Ann Math Stat, 28, 195-241.

11. Brinck K. (1991): Untersuchungen zur Regulation der Biosynthese von Soraphen durch *Sorangium cellulosum* So ce26. Dissertation, Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig.
12. Bu'Lock J.D. (1961): Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances in Applied Microbiology*, 3, 293-342.
13. Carlton B.C., Brown B.J. (1981): Gene mutation. In: *Manual of Methods for General Bacteriology* (ed. Gerhardt), 222-242. American Society for Microbiology, Washington DC 20006.
14. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. (1956): Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28, 1756-1758.
15. Cheng Y.R., Fang A., Demain A.L. (1995): Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 1096-1098.
16. Crueger W., Crueger A. (1989): *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. Oldenbourg Verlag, München.
17. Davison J. (1988): Plant beneficial bacteria. *Biotechnology*, 6, 282-286.
18. Demain A.L. (1973): Mutation and the production of secondary metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, 16, 177-202.
19. Demain A.L., Zhang J. (1998): Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*: the methionine story. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18, 283-294.
20. Drew S.W., Demain A.L. (1973): Methionine control of cephalosporin C formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 743-754.
21. Duke R.C., Ojcius D.M., Young J.D. (1996): Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, 12, 48-55.
22. Elander R.P. (1980): New genetic approaches to industrially important fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 22 (Suppl 1), 49-61.

23. Freyer S., Weuster-Botz D., Wandrey C. (1992): Medienoptimierung mit genetischen Algorithmen. *BioEngineering*, 5+6, 16-25.
24. Gerth K., Bedorf N., Höfle G., Irschik H., Reichenbach H. (1996): Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) - Production, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 49, 560-563.
25. Gerth K., Trowitzsch W., Piehl G., Schultze R., Lehmann J. (1984): Inexpensive media for mass cultivation of myxobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 23-28.
26. Gomes J., Gomes I., Esterbauer H., Kreiner W., Steiner W. (1989): Production of cellulases by a wild strain of *Gliocladium virens*: optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 601-608.
27. Gräfe U. (1992): Der mikrobielle Sekundärstoffwechsel als Quelle der Antibiotikumbildung. In: *Biochemie der Antibiotika*, 41-58. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
28. Gräfe U. (1992): Quantitative Aspekte der Biosynthese von Sekundärmetaboliten: genetische und physiologische Faktoren. In: *Biochemie der Antibiotika*, 451-476. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
29. Grimm K. (1978): Comparison of spontaneous, UV-induced and nitrosoguanidine-induced mutability to drug resistance in myxobacteria. *Journal of Bacteriology*, 135, 748-753.
30. Gronewold T.M., Sasse F., Lünsdorf H., Reichenbach H. (1999): Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells. *Cell and Tissue Research*, 295, 121-129.
31. Hartmeier W. (1986): *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer-Verlag, Berlin.
32. Höfle G. (1998): Persönliche Mitteilung. Abteilung Naturstoffchemie, GBF mbH, Braunschweig.

33. Imai Y., Takei H. (1987): A simple Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> feeding method for K<sub>L</sub> a measurement in large-scale fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 982-993.
34. Irschik H., Augustiniak H., Gerth K., Höfle G., Reichenbach H. (1995): The ripostatins, novel inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *Journal of Antibiotics*, 48, 787-792.
35. Irschik H., Gerth K., Höfle G., Kohl W., Reichenbach H. (1983): The myxopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *Journal of Antibiotics*, 36, 1651-1658.
36. Irschik H., Gerth K., Kemmer T., Steinmetz H., Reichenbach H. (1983): The myxovalargins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). I. Cultivation, isolation, and some chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 36, 6-12.
37. Irschik H., Jansen R., Gerth K., Höfle G., Reichenbach H. (1987): The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *Journal of Antibiotics*, 40, 7-13.
38. Irschik H., Jansen R., Höfle G., Gerth K., Reichenbach H. (1985): The corallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxobacteria*. *Journal of Antibiotics*, 38, 145-152.
39. Irschik H., Reichenbach H. (1985): The mechanism of action of myxovalargin A, a peptide antibiotic from *Myxococcus fulvus*. *Journal of Antibiotics*, 38, 1237-1245.
40. Irschik H., Reichenbach H. (1985): An unusual pattern of carbohydrate utilization in *Coralloccoccus coralloides*. *Archives of Microbiology*, 142, 40-44.
41. Jansen R., Kunze B., Wray V., Reichenbach H., Jurkiewicz E., Hunsmann G. (1991): Phenoxan: a novel inhibitor of HIV-1 infection in cell cultures from *Polyangium* sp., strain P1 VO19 (myxobacteria). *Liebigs Annalen der Chemie*, 7, 707-708.
42. Jansen R., Washausen P., Kunze B., Reichenbach H., Höfle G. (1999): The crocacins, novel antifungal and cytotoxic antibiotics from *Chondromyces pediculatus*

- (myxobacteria): isolation and structure elucidation *Chondromyces crocatus*. *European Journal of Organic Chemistry*, 1999, 1085-1089.
43. Kai G., Weber A.S. (1991): Streptomycin-resistant mutant production in an continuous-flow UV mutation device. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 107-112.
  44. Kai G., Weber A.S., Ying W.C. (1991): Use of continuous-flow UV-induced mutation technique to enhance chlorinated organic biodegradation. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 99-106.
  45. Kaiser D., Onken U., Sattler I., Zeeck A. (1994): Influence of increased dissolved oxygen concentration on the formation of secondary metabolites by manumycin-producing *Streptomyces parvulus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 3, 309-312.
  46. Karutz M., Joks B., Freyer S., Weuster-Botz D., Wandrey C. (1992): Optimierung der Spurenelement-Konzentration bei der fermentativen L-Isoleucin-Produktion - Anwendung Genetischer Algorithmen. *BioEngineering*, 5+6, 26-34.
  47. Kempf M., Theobald U., Fiedler H.P. (1997): Influence of dissolved O<sub>2</sub> on the fermentative production of gallidermin by *Staphylococcus gallinarum*. *Biotechnology Letters*, 19, 11, 1063-1065.
  48. Khalil M.W. (1999): Tubulysine aus Myxobakterien: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus. Dissertation, Technische Universität Carola-Wilhelmina, Braunschweig.
  49. Kinzel J.J., Bhattacharjee J.K. (1982): Lysine biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*: properties of pipelicolic acid oxidase. *Journal of Bacteriology*, 151, 1073-1077.
  50. Kleinkauf H., van Liempt H., Palissa H., von Döhren H. (1992): Biosynthesis of peptides: a non-ribosomal system. *Naturwissenschaften*, 79, 153-162.
  51. Kleinkauf H., von Döhren H. (1987): Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annual Review of Microbiology*, 41, 259-289.

52. Kunze B., Höfle G., Reichenbach H. (1987): The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 40, 258-265.
53. Kunze B., Jansen R., Höfle G., Reichenbach H. (1994): Crocacin, a new electron transport inhibitor from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *Journal of antibiotics*, 47, 881-886.
54. Kunze B., Jansen R., Pridzun L., Jurkiewicz E., Hunsmann G., Höfle G., Reichenbach H. (1992): Phenoxan, a new oxazole-pyrone from myxobacteria: production, antimicrobial activity and its inhibition of the electron transport in complex I of the respiratory chain. *Journal of Antibiotics*, 45, 1549-1552.
55. Kunze B., Kemmer T., Höfle G., Reichenbach H. (1984): Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 37, 454-461.
56. Kunze B., Kohl W., Höfle G., Reichenbach H. (1985): Production, isolation, physico-chemical and biological properties of angiolum A, a new antibiotic from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales). *Journal of Antibiotics*, 38, 1649-1654.
57. Linek V., Vacek V., Benes P. (1987): A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic model for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. *Chem Eng J*, 34, 11-34.
58. Madry N., Sprinkmeyer R., Pape H. (1979): Regulation of tylosin synthesis in *Streptomyces*: effects of glucose analogs and inorganic phosphate. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 7, 365-370.
59. Möllney M., Freyer S., Wichert W., Weuster-Botz D. Computer Programm: GALOP v2.20 . Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich.
60. Ochi K., Tsurumi Y., Shigematsu N., Iwami M., Umehara K., Okuhara M. (1988): Physiological analysis of bicozamycin high-producing *Streptomyces griseoflavus* used at industrial level. *Journal of Antibiotics*, 41, 1106-1115.



61. Paiva N.L., Demain A.L., Roberts M.F. (1993): The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 581-585.
62. Rainer B.W. (1990): Determination methods of the volumetric oxygen transfer coefficient K<sub>La</sub> in bioreactors. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 4, 185-196.
63. Reichenbach H. (1986): The myxobacteria: common organisms with uncommon behaviour. *Microbiological Sciences*, 3, 268-274.
64. Reichenbach H., Dworkin M. (1992): The myxobacteria. In: *The Prokaryotes* (eds. A Balows, HG Trüper, M Dworkin, W Harder, KH Schleifer), 3416-3487. Springer, New York.
65. Reichenbach H., Gerth K., Irschik H., Kunze B., Höfle G. (1988): Myxobacteria: a source of new antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 6, 115-121.
66. Reichenbach H., Höfle G. (1989): The gliding bacteria: a treasury of secondary metabolites. *Progress in Industrial Microbiology*, 27, 79-100.
67. Reichenbach H., Höfle G. (1993): Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol Adv*, 11, 219-277.
68. Reichenbach H., Höfle G., Sasse F., Steinmetz H. (1998): Tubulysine A + B: Verbindungen mit antimykotischer und cytostatischer Wirkung, Herstellungsverfahren, Mittel und DSM 11 092. DE19638870A1 1980326, Deutschland.
69. Sasse F. (1997): Persönliche Mitteilung. Abteilung Naturstoffbiologie, GBF.
70. Sasse F., Steinmetz H., Höfle G., Reichenbach H. (1993): Rhizopodin, a new compound from *Myxococcus stipitatus* (myxobacteria) causes formation of rhizopodia-like structures in animal cell cultures. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 46, 741-748.
71. Sasse F., Steinmetz H., Höfle G., Reichenbach H. (1995): Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria).

Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *Journal of Antibiotics*, 48, 21-25.

72. Schummer D., Forche E., Wray V., Domke T., Reichenbach H., Höfle G. (1996): Vioprolides: New antifungal and cytotoxic peptolides from *Cystobacter violaceus*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 6, 971-978.
73. Silveira R.G., Kakizono T., Takemoto S., Nishio N., Nagai S. (1991): Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72, 20-25.
74. Vanek Z., Hostalek Z. (1986): Overproduction of microbial metabolites. Butterworth, Boston.
75. Vollenweider I., Groscurth P. (1992): Comparison of four DNA staining fluorescence dyes for measuring cell proliferation of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Journal of Immunological Methods*, 149, 133-135.
76. Votruba J., Pilat P., Prokop A. (1975): Application of modified Rosenbrock's method for optimization of nutrient media used in microorganism culturing. *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 1833-1837.
77. Weuster-Botz D., Pramatarova V., Spassov G., Wandrey C. (1995): Use of genetic algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high Hydrocortisone D1-Dehydrogenase activity. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 64, 386-392.
78. Weuster-Botz D., Wandrey C. (1995): Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase. *Process Biochemistry*, 30, 563-571.
79. Wickwire B.M., Harris C.M., Harris T.M., Broquist H.P. (1990): Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*. I. The lysine saccharopine, delta 1-piperidine-6-carboxylic acid pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 14742-14747.

80. Wickwire B.M., Wagner C., Broquist H.P. (1990): Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*. II. Saccharopine oxidase: a unique flavin enzyme involved in pipecolic acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 14748-14753.
81. Wonderware Corporation. (1998): Computer Programm: InTouch FactorySuite 2000 v. FS2000 01-613 . Wonderware Corporation, Irvine, CA, USA.
82. Yamane Y.I., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N. (1997): Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11, 4471-4478.
83. Zähler H. (1979): What are secondary metabolites? *Folia Microbiologica*, 24, 435-443.



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name:	Jürgen Heil
Geburtsdatum:	26.09.1969
Geburtsort:	Meppen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

### **Schulausbildung:**

08 / 1976 - 07 / 1980	Marien-Grundschule Meppen
08 / 1980 - 07 / 1982	Orientierungsstufe Meppen
08 / 1982 - 05 / 1989	Windthorst-Gymnasium Meppen
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### **Wehrdienst:**

06 / 1989 - 08 / 1990	Sanitätsdienst in Leer als Grundwehrdienstleistender
-----------------------	--

### **Hochschulstudium**

10 / 1990 - 03 / 1991	Diplom Physik, RWTH Aachen
04 / 1991 - 08 / 1996	Diplom Biologie, RWTH Aachen
04 / 1993	Biologie Vordiplomprüfung
08 / 1996	Abschluß des Biologiestudiums mit der Diplomprüfung
09 / 1996	Anstellung als Wissenschaftliche Hilfskraft an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig und Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation